

UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULARBIOLOGIE LINEARER PLASMIDE BEI CLAVICEPS PURPUREA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Birgitt M. Oeser

Bochum 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULARBIOLOGIE
LINEARER PLASMIDE BEI
CLAVICEPS PURPUREA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Birgitt M. Oeser

Bochum 1988

Referent: Prof. Dr. P. Tudzynski

Koreferent: Prof. Dr. G. Link

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.1988

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. Tudzynski, danke ich herzlich für die vielseitige Förderung meiner Arbeit, sein waches Interesse am Fortgang der Arbeit und für die anregenden Dispute.

Danken möchte ich allen Mitgliedern des Lehrstuhles für Allgemeine Botanik (Ruhr-Universität Bochum), des Institutes für Mikrobiologie (Universität Düsseldorf) und des Lehrstuhles für Allgemeine Botanik/Mikrobiologie (Westfälische Wilhelms-Universität Münster), die mir mit Rat und Tat halfen, und allen anderen, die mir während der Zeit meiner Promotion zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus dem Cusanuswerk (Bonn) für die geistige und materielle Unterstützung meiner Arbeit.

Die Arbeit wurde durch Sachmittel der "Deutschen Forschungsgemeinschaft" (Bonn) gefördert.

Liste der verwendeten Abkürzungen und Zeichen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Amminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CMS	cytoplasmatische männliche Sterilität
COI	Untereinheit I der Cytochrom c-Oxidase
cp	Chloroplasten
CsCl	Cäsiumchlorid
D	Deutschland
dATP	Adenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin
DR	"direct repeat"
et al.	et alii
f. sp.	forma specialis
G	Guanin
GB	Großbritannien
hmw	hochmolekular ("high molecular weighted")
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
Leu	Leucin
lrRNA	große ribosomale RNA ("large ribosomal RNA")
Lys	Lysin
M	Molar
min	Minute
mt	mitochondrial
N	A,T,G oder C
P	Phosphat
pers. Mitteil.	persönliche Mitteilung
Pro	Prolin
rRNA	ribosomale RNA
RNA	Ribonukleinsäure
Ser	Serin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
tRNA	Transfer-RNA
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin

TIR	"terminal inverted repeat"
Upm	Umdrehungen pro Minute
URF	"unassigned reading frame"
U	Umdrehung(en)
Val	Valin
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent
=	gleich, entspricht
≥	größer oder gleich als

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einführung und Problemstellung</u>	1
2.	<u>Material und Methoden</u>	7
3. 4.	<u>Ergebnisse</u>	11
3.	pClK1 (Stamm K)	11
3.1	Sequenzierung des Plasmides pClK1	11
3.2	Analyse der pClK2/3-Übergangsregion	16
3.3	Analyse des "terminal inverted repeat" (TIR)	18
3.4	Analyse der Codierungskapazität	21
3.4.1	Homologie zu RNA-Molekülen	21
3.4.2	Suche nach URFs	21
3.4.3	Homologie der pClK1-URFs zu bekannten Proteinen	22
3.4.3.1	URF1	22
3.4.3.2	URF2	26
3.4.3.3	URF3, URF4, URF5 und URF6	29
4.	Homologie von pClK1 zur hmw mtDNA des Stammes W3	30
4.1	Eingrenzung und Charakterisierung der Homologie von pClK1 zur hmw mtDNA des Stammes W3	30
4.2	Sequenzierung der zu pClK1 homologen Region der hmw mtDNA (Stamm W3)	32
4.3	Sequenzanalyse der homologen Region zwischen pClK1 und der hmw mtDNA von W3 sowie angrenzender Bereiche	34
5.	<u>Diskussion</u>	38
5.1	Entstehen von pClK2 und pClK3	38
5.2	"Terminal inverted repeat" (TIR)	40
5.3	Codierungskapazität	41
5.3.1	Vergleich des möglichen URF1-Produktes von pClK1 zu DNA-Polymerasen	42
5.3.2	Vergleich des möglichen URF2-Produktes von pClK1 zu RNA-Polymerasen	44
5.3.3	Codongebrauch der beiden großen URFs von pClK1	45
5.3.4	URF3, URF4, URF5 und URF6	46

5.3.5	Codierung des terminalen Proteins	47
5.3.6	Vergleich der Codierungskapazität von pClK1 mit der anderer linearer Plasmide	49
5.4	Korrelation der Ergebnisse von Sequenzanalyse und Transkriptanalyse	50
5.5	Homologie von Claviceps-Plasmiden zur hmw mtDNA: Erklärungsversuch anhand eines Beispiels	52
5.6	Plasmid-Definition	57
5.7	Mögliche Herkunft und Funktion von pClK1	58
6.	<u>Zusammenfassung</u>	61

Literaturverzeichnis

Anhang A: Hybridplasmide, die im Rahmen der Arbeit konstruiert wurden

Anhang B: Vergleich der DNA-Polymerasen, die Homologie zum URF1-Produkt des Plasmides pClK1 besitzen

Vorveröffentlichungen

1. Einführung und Problemstellung

Autonom replizierende extrachromosomale Nukleinsäuren – kurzum Plasmide – kommen nicht nur in Prokaryonten wie Escherichia coli vor. Sie sind auch eine häufige Erscheinung in Eukaryonten. Viele dieser Plasmide zeigen eine lineare Struktur.

Eine Übersicht von eukaryontischen Plasmiden findet man in dem Buch "Plasmids of Eukaryotes" (Esser et al. 1986). Speziell mit extrachromosomalen Elementen in niedrigen Eukaryonten befaßt sich ein von Wickner et al. (1986) herausgegebenes Buch, das die Beiträge eines Kongresses zusammenfaßt.

Ein gemeinsames Strukturmerkmal aller linearen Plasmide sind Sequenzwiederholungen an ihren Enden. Doch nur wenige Systeme linearer Plasmide sind gut charakterisiert. Zu den gut untersuchten Systemen gehören die mitochondrialen Plasmide S1 und S2 von Zea mays (Pring und Lonsdale 1985) und die Plasmide pGK11 und pGK12 der Hefe Kluyveromyces lactis (Gunge et al. 1983).

Die mitochondrialen (mt) Plasmide S1 und S2 (Z. mays) treten stets zusammen im S-Cytoplasma des Mais auf, in dem man vier Cytoplasmen unterscheidet – das fertile N-Cytoplasma und die drei sterilen Cytoplasmen C, S und T. S1 und S2 besitzen die gleichen "terminal inverted repeat"s (TIR) und eine gleiche endständige Region von 1462 bp (Paillard et al. 1985). Ihre Enden tragen 5'-gebundene terminale Proteine (Kemble und Thompson 1982).

Die Herkunft von S1 kann man hypothetisch mit einer Rekombination zwischen Plasmiden erklären. In lateinamerikanischen Mais-Rassen kommt das Plasmidpaar R1 und R2 vor. R2 entspricht S2, während R1 nur zum Teil zu S1 homolog ist. Eine Rekombination zwischen R1 und S2/R2 könnte zu einem Transfer einer 1462 bp großen Region von S2/R2 auf R1 geführt haben und so das Entstehen des Plasmides S1 erklären (Levings III et al. 1983).

Es existiert eine Homologie zwischen dem TIR-Beginn der S-Plasmide und dem kurzen konservierten TIR von Bacillus-Phagen (Levings III und Sederoff 1983). Die Replikation dieser den Plasmiden strukturell ähnlichen Bacillus-Phagen wird hauptsächlich am Phagen Phi29 untersucht (Salas 1988). Ein Hauptmerkmal seines Replikationsmodus besteht darin, daß die virale DNA-Polymerase als Primer ein an das terminale Protein geknüpft Nukleotid benutzt ("protein-priming"). Die Enden des Phagen scheinen spezifische Sequenzen zu besitzen, die Erkennungscharakter für diese Art von Initiationsreaktion haben. Möglicherweise haben die endständigen, zu denen der Bacillus-Phagen homologen Nukleotide der linearen Plasmide einen ähnlichen Erkennungscharakter. Auf Grund der ähnlichen Struktur der S-Plasmide und der Bacillus-Phagen könnte man einen ähnlichen Replikationsmodus erwarten, so wie auch die strukturell den Bacillus-Phagen gleichenden Adenoviren den gleichen Replikationsmodus wie diese besitzen.



S1 und S2 besitzen mehrere URFs (URF = unassigned reading frame). Jeweils dem Produkt des größten URFs konnte auf Grund von Aminosäurehomologien eine Funktion zugewiesen werden. Der größte URF des Plasmides S1 codiert wahrscheinlich für eine DNA-Polymerase (Kuzmin und Levchenko 1987). Seine Translation wurde von Zabala und Walbot (1988) nachgewiesen. Als Ergänzung codiert der größte URF des Plasmides S2 offenbar für eine RNA-Polymerase (Kuzmin et al. 1988). Auch dieser URF wird translatiert (Manson et al. 1986, Zabala et al. 1987).

Gut beschrieben ist das Phänomen der Rekombination der Plasmide S1 und S2 (Z. mays) mit TIR-Sequenzen, die in der hochmolekularen (hmw) mtDNA vorhanden sind. Zu den TIRs der Plasmide homologe Sequenzen kommen in der hmw mtDNA des S-Cytoplasmas vor. Dort können die beiden Plasmide S1 und S2, deren TIR identisch ist, über die homologen Bereiche mit der hmw mtDNA rekombinieren. Auch im N-Cytoplasma kommen zu S1 und S2 homologe Sequenzen in der hmw mtDNA vor. Allerdings legt eine Charakterisierung dieser Homologie den Schluß nahe, daß die Plasmidsequenzen in der hmw mtDNA des N-Cytoplasma wahrscheinlich von dem mit S-Plasmiden verwandtem Plasmidpaar R1 und R2 lateinamerikanischer Maisrassen abstammen (Schardl et al. 1984, Isaac et al. 1985).

Die Funktion des Plasmidpaares S1 und S2 ist noch unklar. Sie wurden ursprünglich in Zusammenhang mit der Ausprägung der cytoplasmatisch männlichen Sterilität gebracht. Im Verlauf der Untersuchungen der S-Plasmide wurde ihre Beziehung zur Sterilität immer unklarer (Schardl et al. 1985, Escote et al. 1985, Escote-Carlson et al. 1988).

Als cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) bezeichnet man das mütterlich vererbte Unvermögen einer Pflanze, funktionstüchtigen Pollen zu erzeugen. Einen Überblick über den Stand der CMS-Forschung findet man in einem Review von Newton (1988).

Während die S-Plasmide ein Beispiel für lineare Plasmide höherer Pflanzen darstellen, repräsentieren die Plasmide pGK11 und pGK12 von K. lactis lineare Plasmide von Hefen. Die Plasmide sind für die Produktion von Killertoxinen verantwortlich, die gegen sensitive Hefestämme wirken. Die "Killerplasmide" scheinen cytoplasmatisch lokalisiert zu sein (Stam et al. 1986, Fujimura et al. 1988, Romanos und Boyd 1988). Wie die S-Plasmide treten die Plasmide pGK11 und pGK12 gemeinsam auf. Das Plasmid pGK12 kann allerdings auch ohne das Plasmid pGK11 existieren. Man vermutet auf dem Plasmid pGK12 Funktionen, die für den Erhalt beider Plasmide in der Zelle wichtig sind (Niwa et al. 1981, Wesolowski et al. 1982).

Beide Plasmide besitzen TIRs und 5'-gebundene terminale Proteine (Hishinuma et al. 1984, Kiguchi et al. 1984, Stam et al. 1986). Folglich ähnelt auch ihre Struktur - wie die der Plasmide S1 und S2 (Z. mays) - der Struktur von Bacillus-Phagen und Adenoviren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Replikation von pGK11 und pGK12 deuten daraufhin, daß ein zu Bacillus-Phagen und Adenoviren analoger Replikationsmodus vorliegt (Fujimura et al. 1988).

Sowohl pGK11 als auch pGK12 besitzen einen URF, dessen mutmaßliches Produkt eine DNA-Polymerase ist. Die Aminosäuresequenz der URFs besitzt die gleichen charakteristischen Domänen wie der größte URF von S1 (Z. mays) (Jung et al. 1987a, Tommasino et al. 1988). Auf dem Plasmid pGK11 gibt es noch drei weitere größere URFs, die ebenso wie der DNA-Polymerase URF transkribiert werden (Stark et al. 1984). Sie stehen in Verbindung zum Killerphänotyp. Zwei der URFs codieren für die Killertoxine und einer für die Immunität gegenüber den Toxinen. Bei der Untersuchung des Immunitäts-Phänotypes wurde gleichzeitig festgestellt, daß das Plasmid pGK12 nicht nur für die Replikation beider Plasmide, sondern auch für die Expression der Immunität essentiell ist (Stark und Boyd 1986, Tokunaga et al. 1987).

Kein System linearer Plasmide von filamentösen Pilzen ist bislang ebenso gründlich untersucht worden wie das der "Killerplasmide" (K. lactis) oder das der S-Plasmide (Z. mays). Lineare Plasmide wurden in folgenden filamentösen Pilzen gefunden: Agaricus bitorquis (Mohan et al. 1984), Ascobolus immersus (Francou et al. 1987, Meinhardt et al. 1986), Ceratocystis fimbriata (Giasson und Lalonde 1987, Normand et al. 1987), Claviceps purpurea (Tudzynski et al. 1983, Tudzynski und Düvell 1985), Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans (Kistler und Leong 1986), Fusarium solani f. sp. cucurbitae (Samac und Leong 1988), Gaeumannomyces graminis (Honeyman und Currier 1986), Morchella (Meinhardt und Esser 1987), Neurospora intermedia (Bertrand et al. 1986) und Rhizoctonia solani (Hashiba et al. 1984).

Bei vielen der beschriebenen linearen Plasmide von Hyphenpilzen wurden TIRs und/oder 5'-gebundene terminale Proteine nachgewiesen. Die meisten der Plasmide scheinen mitochondrial lokalisiert zu sein. Besonderes Interesse findet das Kalilo-Plasmid von N. intermedia, dessen Insertion in die hmw mtDNA zur Seneszenz des Pilzes führen kann.

Die Plasmide des Ascomyceten C. purpurea werden einer intensiven Charakterisierung unterzogen (Tudzynski et al. 1986, Tudzynski und Esser 1986, Düvell et al. 1988). Der Mutterkornpilz C. purpurea parasitiert auf Roggen und anderen Gräsern. Zur sexuellen Fortpflanzung ist der Pilz nur auf seinen Wirtspflanzen fähig, doch ist er im Labor in axenischer Kultur haltbar. Zahlreiche Feldisolate des Mutterkornpilzes enthalten mitochondriale (mt) Plasmide. Soweit daraufhin untersucht, ähneln sich die Plasmide in ihrer Struktur. Sie sind linear, besitzen TIRs und wahrscheinlich 5'-gebundene, terminale Proteine. Ihre Restriktionskarten zeigen unterschiedliche Grade der Übereinstimmung.

Die Plasmide des Stammes K werden eingehend untersucht (Tudzynski et al. 1983, Tudzynski und Esser 1986, Düvell 1988):

- 1) Der Stamm K enthält drei Plasmide: pClK1 (6,7 kb), pClK2 (5,5 kb) und pClK3 (1,2 kb). Das Plasmid pClK1 besitzt die oben erwähnten strukturellen Merkmale. Die beiden kleineren Plasmide sind kolinear zu pClK1 (s. Abb.1). Sie entstehen eventuell aus pClK1. An diesem Prozeß könnte eine Endonuklease beteiligt sein.

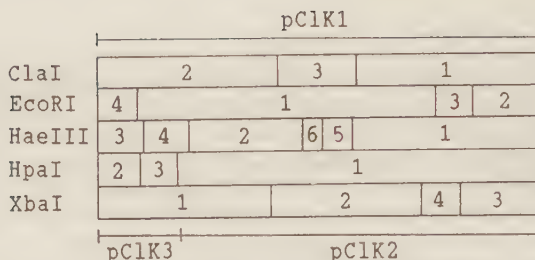


Abb.1

Restriktionskarte des Plasmides pClK1 (6,7 kb). Die Regionen, die den Plasmiden pClK2 und pClK3 entsprechen, sind gekennzeichnet.

- 2) Das Plasmid pClK1 wird transkribiert. Neben zwei hauptsächlich auftretenden Transkripten von 3,5 kb und 3,15 kb, deren Lage auf dem Plasmid kartiert werden konnte, gibt es noch weitere kleinere Transkripte.
- 3) In nichtstringenten Hybridisierungen konnte gezeigt werden, daß pClK1 Homologie zu verschiedenen linearen Plasmiden aufweist. Dazu gehören u.a. die bereits erwähnten Plasmide pGK12 (*K. lactis*) und S1 (*Z. mays*).
- 4) Ein mit den Plasmiden korrelierter Phänotyp konnte nicht gefunden werden.
- 5) Unter stringenten Bedingungen ist keine Homologie des Plasmides pClK1 zur hmw mtDNA seines eigenen Stammes erkennbar, jedoch zeigt das Plasmid deutliche Homologie zu der hmw mtDNA anderer *Claviceps*-Stämme. Eine der homologen Regionen liegt auf einem 2,8 kb großen EcoRI/SalI-Fragment der hmw mtDNA des Stammes W3.

Als "wahre" mitochondriale Plasmide werden allerdings nur solche kleinen DNA- bzw. RNA-Moleküle bezeichnet, die keine Homologie zur hmw mtDNA besitzen. Im Gegensatz zu den Plasmiden werden die "defekten" mtDNAs gesetzt, die aus der hmw mtDNA durch Deletionen und/oder Umstellungen von Sequenzen hervorgehen (Tudzynski 1982, Garber et al. 1986, Lambowitz et al. 1986). Ein klares Beispiel für mitochondriale Plasmide sind die zirkulären Plasmide von *Neurospora* (Stohl et al. 1982, Natvig et al. 1984, Nargang et al. 1984), während die mtDNA der Petit-Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* (Bernardi 1982) eindeutig zu den "defekten" mtDNAs gehört.

Da die Homologiebereiche alle kleiner als das Plasmid pClK1 selber zu sein scheinen und zudem auf der hmw mtDNA anderer Stämme liegen, dürfte es gerechtfertigt sein, pClK1 als mitochondriales Plasmid zu betrachten. Während pClK1 nur Homologie zur hmw mtDNA anderer Stämme zeigt, besitzen *Claviceps*-Plasmide anderer Stämme interessanterweise oft sowohl Homologie zu fremder hmw mtDNA als auch zur eigenen hmw mtDNA. Auch hier scheint kein homologer Bereich einem ganzen Plasmid zu entsprechen (Tudzynski, Rogmann-Backwinkel pers. Mitteil.).

Das Vorkommen von Plasmid-homologen Regionen in der hmw mtDNA beruht wahrscheinlich auf Rekombinationsvorgängen und nicht auf zufälligen Ähnlichkeiten.

Dafür sprechen Größe und Grad der Homologien, deren Southern-Analyse unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird (Tudzynski et al. 1986, Tudzynski und Esser 1986, Hessberg-Stutzke, Rogmann-Backwinkel und Tudzynski pers. Mitteil.).

Das Anliegen dieser Arbeit - Untersuchungen zur Molekularbiologie linearer Plasmide bei *Claviceps purpurea* - besteht darin, das Plasmidsystem des Mutterkornpilzes weiter zu charakterisieren. Das Sequenzieren des Plasmides pClK1 (Stamm K) und der zu pClK1 homologen Region der hmw mtDNA des Stammes W3 soll eine Grundlage bilden, die hilft, folgende Fragen zu klären:

- 1) Welche Beziehung besteht zwischen den Plasmiden pClK1, pClK2 und pClK3: Ist es möglich, die These, daß pClK2 und pClK3 durch das Einwirken einer Endonuklease aus pClK1 hervorgegangen sind, zu stützen?
- 2) Besitzt das Plasmid pClK1 einen vollkommenen TIR? Beinhaltet der TIR auffällige Strukturen? Gibt es Sequenzhomologien zu TIRs anderer linearer Plasmide oder Viren, die in ihrer Struktur (TIR, terminales Protein) pClK1 ähneln? Entsprechen etwaige Homologien den Befunden bei anderen Systemen?

Ange­sicht der Homologie-Diskussion in der Zeitschrift "Cell" (Cell 51: 515-516 (1987) Nonhomologous views of a terminology muddle), soll hier darauf hingewiesen werden, daß der Begriff "Homologie" in dieser Arbeit in der Bedeutung einer Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen verwendet wird, ohne damit eine Verwandtschaft zweier Sequenzen implizieren zu wollen.

- 3) Gibt es möglicherweise Gene auf dem Plasmid pClK1?

Da pClK1 transkribiert wird, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß Gene auf dem Plasmid lokalisiert sind. Eine Sequenzanalyse kann Hinweise darauf geben, ob die Genprodukte aus RNA- und/oder Proteinmolekülen bestehen. Möglicherweise codiert das Plasmid pClK1 für Proteine, die für seine Erhaltung wichtig sind.

- 4) Welche Schlüsse läßt die Untersuchung der zu pClK1 homologen Region einer hmw mtDNA von *C. purpurea* zu?

Eine Charakterisierung des zu pClK1 homologen Fragmentes der hmw mtDNA von W3 kann klären, ob es sich bei den Plasmid-homologen Regionen in der mtDNA von *Claviceps* um eine zufällige Homologie oder um das Ergebnis einer Rekombination handelt. Im Falle eines deutlichen Hinweises auf eine Neukombination von hmw mtDNA und Plasmiden (Rekombination), sollte es möglich sein, eine These in Bezug auf den Rekombinationsweg zu finden.

Für die Rekombination von linearen Molekülen, die durch Sequenzwiederholungen an ihren Enden gekennzeichnet sind, gibt es viele Beispiele. Sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten findet man Transposone - genetische Elemente, die ihren Ort in der DNA wechseln können (Kleckner 1981, Finnegan 1985). Bei Viren ist die Rekombination von Adenoviren mit der Wirts-DNA von Säugetieren bekannt (Doerfler 1988). Rekombi-

nation von Plasmiden mit der hmw mtDNA findet man beim Kalilo-Plasmid (N. intermedia) und den Plasmiden S1 und S2 (Z. mays) (Bertrand et al. 1986, Schardl et al. 1984, Isaac et al. 1985).

- 5) Fällt pCLK1 tatsächlich unter die Definition "Plasmid"?
- 6) Was läßt sich unter Berücksichtigung aller bekannten Daten über die Funktion und Herkunft des Plasmides pCLK1 sagen?

Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchung des Plasmides pCLK1 (C. purpurea) und die Charakterisierung der pCLK1-homologen Region in der hmw mtDNA dargestellt. Anschließend erfolgt eine Diskussion der vorgelegten Fragenkomplexe.

2. Material und Methoden

Stämme

E. coli: Die Stämme JM83 (ara, del [lac, pro], str A, thi-1, [phi80 dlacZ del M15] - Viera und Messing 1982) und DH5 α (F⁻, end A1, hsd R17 (r_k⁻, m_k⁺), sup E44, thi-1, lambda⁻, recA1, phi80 dlacZ del M15 - BRL) wurden als Rezipienten bei DNA-Transformationen eingesetzt.

C. purpurea: Der Stamm K (Kaldenkirchen, D. Wirt: Secale) enthält die Plasmide pClK1, pClK2 und pClK3 (Tudzynski et al. 1983).

Stamm W3 (Burdleigh, GB. Wirt: Agropyron) (Tudzynski und Esser 1986): Die hmw mtDNA des Stammes W3 trägt eine Region, die Homologie zum Plasmid pClK1 aufweist.

Medien und Wachstumsbedingungen

Medium für E. coli: LB (Miller 1972).

Für Selektion auf Ampicillin-Resistenz wurde dem Medium 100 mg/ml Ampicillin zugesetzt.

Medium für C. purpurea: BII (Esser und Tudzynski 1978).

BII-Flüssigmedium enthält anstelle von 10% nur 5% Saccharose, um die Kohlehydrat-Produktion (Schleim!) des Mutterkornpilzes zu mindern.

Festmedium: Zusatz von 2% Agar

Wuchsbedingungen für E. coli: 37°C, 200 Upm bei Schüttelkultur in Flüssigmedium

Wuchsbedingungen für C. purpurea: Auf Platten bei 27°C, in Flüssigkultur bei 30°C.

Plasmide

Klonierungsvektoren. pUC9 (Viera und Messing 1982) und pUC19 (Norrande et al. 1983).

Hybridplasmide:

pPKE1/1, pPKE2, pPKE4/1 - /6, pPKH1, pPKH2, pPKH4, pPKH5, pPKH6 enthalten Restriktionsfragmente des Claviceps-Plasmides pClK1 (Düvell 1988).

pWE3/1 trägt das zu pClK1 homologe EcoRI/SalI-Fragment der hmw mtDNA des Stammes W3 (Tudzynski pers. Mitteil.)

Die Nomenklatur der Hybridplasmide schlüsselt sich folgendermaßen auf:
p = Hybridplasmid, P = kloniertes Fragment entstammt einem Claviceps-Plasmid, kein P = kloniertes Fragment entstammt einer mtDNA von Claviceps, K = Stamm K, W = Stamm W3, E = EcoRI, H = HaeIII, S = SalI. Die Zahlen kennzeichnen das klonierte Fragment z.B. H4 = viertgrößtes HaeIII-Fragment. Mit "/1", "/2" etc. sind Parallelklone markiert.

Die Hybridplasmide, die zusätzlich für diese Arbeit konstruiert wurden, sind mit einer detaillierten Charakteristik im Anhang A zu finden.

DNA-Präparationen

E. coli

- Schnellaufarbeitung von Plasmiden
verändert nach Birnboim und Doly (1979). Die Lysozymbehandlung der Zellen entfiel.
- Schnellaufarbeitung von Plasmiden, die zur Plasmidsequenzierung eingesetzt wurden
modifiziert nach Birnboim und Doly (1979). Das geklärte Lysat wurde phenolisiert, die Nukleinsäuren mit Natriumacetat und Ethanol gefällt und mit RNaseA behandelt. Anschließend wurde die Probe phenolisiert, chloroformiert und die DNA gefällt.
- Isolation von Plasmiden im großen Maßstab (ab 200 ml Anzucht)
verändert nach Holmes und Quickley (1981). Vor dem UZ-Lauf wurde eine Proteinabscheidung vorgenommen - JA20-Rotor, 18000 U/min, 30 min.

C. purpurea

Isolation mitochondrialer Plasmide nach Düvell et al. (1988)

Restriktionsanalyse

Nach Maniatis et al. (1982). Restriktionen von DNA, die aus Schnellaufarbeitungen ohne RNaseA-Behandlung stammten, wurden in Anwesenheit von RNaseA durchgeführt.

Gelelektrophorese

Nach Maniatis et al. (1982). Es wurden 0,7%ige, 1%ige, 2%ige Agarosegele sowie 3%ige und 5%ige Polyacrylamidgele verwandt. Auf Agarosegelen diente Lambda/HindIII, auf Polyacrylamidgelen Lambda/HindIII+EcoRI und pBR322/HaeIII als Molekulargewichtsmarker.

Isolation von DNA aus Gelen

Aus Agarosegelen:

nach McDonnell et al. (1977). Die DNA wurde anschließend über eine ElutipD-Säule (Schleicher und Schüll) gereinigt und konzentriert.

Aus Polyacrylamidgelen:

Das DNA-haltige Gelstück wurde ausgeschnitten, zusammen mit einer 0,3 M Natriumacetat-Lösung durch eine gekürzte Kanüle zentrifugiert und über Nacht bei 37°C bis 40°C geschüttelt. Dabei diffundiert die DNA aus dem sehr fein zerkleinerten Gelstück. Durch eine Zentrifugation über QuickSep-Säulchen (Isolab, USA) wurde das Polyacrylamid von der DNA abgetrennt, die durch Ethanolfällung konzentriert wurde.

Klonierungen

Im Normalfall wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 4:1 eingesetzt. Mußten Fragmente kloniert werden, die unterschiedliche 5'-überhängende Enden trugen, wurden diese durch eine Klenow-Reaktion aufgefüllt. Anschließend wurden sie in einen Vektor mit glatten Enden ligiert.

Deletionsklonierungen von Hybridplasmiden wurden nach dem von Henikoff (1984) beschriebenen Prinzip durchgeführt.

Die Methode ist insbesondere für Vektoren mit Polylinkern geeignet: Die Deletionsklonierung mit Hilfe der ExonukleaseIII benötigt zwei verschieden geartete Restriktionsschnittstellen im Polylinker zwischen Vektor und Insert. Eine Schnittstelle mit mindestens vier 3'-überhängenden Basen schützt den Vektor vor einem ExonukleaseIII-Abbau. Eine zweite Schnittstelle, die entweder 5'-überhängende oder glatte Enden besitzt, ermöglicht den ExonukleaseIII-Angriff auf das Insertfragment. Ein Abstoppen nach verschiedener langer Inkubationszeit mit ExonukleaseIII führt zu verschieden großen Deletionen. Da ExonukleaseIII nur einen Strang der DNA abbaut, muß der andere Strang vor einer Religation des Hybridplasmides mit NukleaseS1 abgedaut werden.

Ligationen der DNA und die Transformation von E. coli wurden entsprechend Kück (1981) durchgeführt.

Alle Transformationsexperimente wurden entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro rekombinierte Nukleinsäuren" des Bundesministers für Forschung und Technologie (Bonn) vom 25.5.1985 durchgeführt.

Radioaktive Markierung von DNA mit ^{32}P

Für Hybridisierungen wurde die DNA entweder durch "nick"-Translation - wie bei Kück (1981) beschrieben - oder durch "random primed labelling" (Feinberg und Vogelstein 1983) mit $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ markiert.

Für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert wurden die DNA-Fragmente entweder 3' endmarkiert mit dem Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI und $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$ oder 5' endmarkiert mit T4 Polynukleotidkinase und $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$. Beide Markierungen wurden in der von Osiewacz (1984) beschriebenen Art und Weise durchgeführt.

DNA-DNA-Hybridisierungen

Das Übertragen der DNA aus E. coli-Kolonien von Platten auf Nitrozellulosefilter wurde nach Grunstein und Hogness (1975) modifiziert. Es wurde keine Vorrichtung zum rutschfesten Bearbeiten der Kolonien verwendet. Außerdem entfiel die ProteinaseK-Behandlung der lysierten Zellen.

Die DNA aus Agarose-Gelen wurde nach Southern (1975) auf Nitrozellulosefilter übertragen.

Die Hybridisierungen selber wurden entweder nach Howley et al. (1979) oder nach Johnson et al. (1984) durchgeführt.

DNA-Sequenzierung

Chemischer Abbau nach Maxam und Gilbert (1980). Die Methode wurde wie in Osiewacz (1984) beschrieben durchgeführt.

Plasmidsequenzierung nach Chen und Seeburg (1985). Als Primer für die auf den Vektoren pUC9 und pUC19 basierenden Hybridplasmiden wurden die Oligonukleotide "CAGGGTTTCCCAGTCACGACGT" und "ACACAGGAAACAGCTATGACCAT" verwandt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I durchgeführt.

Zur Auftrennung der Sequenzierungsprodukte wurden 40cm lange und 0,1mm dicke Polyacrylamid-Harnstoff-Gele (6%ig und 8%ig) benutzt.

Sequenzanalyse

Mit Hilfe des MicroGenie-Programmes (Queen und Korn 1984) und des Programmes HYSTRUC (Mandler 1988), das von Proteinen sowohl eine Hydropathieprofil zeichnet (nach Kyte und Doolittle 1982) als auch eine Sekundärstruktur-Vorhersage gibt (nach Chou und Fasman 1978).

3./4. Ergebnisse

3. pClK1 (Stamm K)

3.1 Sequenzierung des Plasmides pClK1

Die Sequenzierung des linearen Plasmides pClK1 wurde mit klonierten, sich überlappenden Fragmenten durchgeführt. Dabei stellt sich die Frage, ob die Klone, die das "linke" bzw. "rechte" Ende von pClK1 tragen, auch das gesamte native Ende beinhalten.

Die Bezeichnung "linkes" und "rechtes" Ende lehnt sich an die willkürlich gewählte Orientierung des Plasmides pClK1 in Abb.1 an.

Linearität und möglicherweise durch 5'gebundene Proteine blockierte Enden bedingen sowohl die Anwendung besonderer Klonierungsstrategien als auch eine anschließende Unsicherheit bezüglich der Vollständigkeit der Enden (Düvell 1988). Um diese Unsicherheit zu klären, wurden alle vorhandenen Endklone ansequenziert und miteinander verglichen (s. Tab.1). Da die Vollständigkeit der pClK1-Sequenz eine wichtige Voraussetzung für die Analyse des Plasmides und seines TIRs darstellt, wird sie an dieser Stelle diskutiert.

Hybridplasmid	Ende von pClK1	eingesetzter Vektor	Sequenz an der Grenze Vektor/Plasmid-Ende von pClK1
pPKH1	rechts	pUC9/ <u>SmaI</u>	CGGATC <u>CCC</u> GAGAGAGCAGT
pPKE2	"	pBR325/ <u>PvuII</u> +EcoRI	GATTTT <u>CAG</u> GAGAGAGCAGT
pPKE4/1	links	pUC9/ <u>HindIII</u> +EcoRI	GGTCAG <u>GTC</u> GAGAGAGCAGT
pPKE4/2	"	"	GGTCAG <u>GTC</u> GAGAGAGCAGT
pPKE4/3	"	"	GGTCAG <u>GTC</u> AGAGAGCAGT
pPKE4/4	"	"	GGTCAG <u>GTC</u> AGCAGT
pPKE4/5	"	"	GGTCAG <u>GTC</u> GAGAGAGCAGT
pPKE4/6	"	"	GGTCAG <u>GTC</u> GAGAGAGCAGT
pPKHi4	"	pUC19/ <u>HindIII</u>	CTGCA <u>GTC</u> GAGAGAGCAGT

Tab.1

Vergleich der Sequenzen des rechten bzw. linken Plasmid-Endes von pClK1 anhand vorhandener Hybridplasmide. Die Vektorsequenz an der Grenze zwischen Vektor und Plasmid-Ende ist unterstrichen; die dort liegende Klonierungsstelle ist umrandet. Vektorsequenzen, die nicht zu erwarten wären, sind unterbrochen unterstrichen.

Vom rechten Ende existieren zwei Klone: pPKH1 und pPKE2. Im Hybridplasmid pPKH1 findet man erwartungsgemäß die Sequenzhälfte der Klonierungsschnittstelle gefolgt von der pClK1-Endsequenz. Dem Hybridplasmid pPKE2 dagegen fehlen innerhalb der Vektorsequenz ca. 130 bp direkt vor der Klonierungsschnittstelle. Eine Analyse der

Vektorsequenz ergab, daß eine Fehlpaarung während der Replikation, an der ein "direct repeat" (DR) beteiligt ist, zu der Deletion geführt haben könnte.

Untersucht man die betreffende Sequenz im E. coli-Vektor pBR325 (Alton und Vapnek 1979) – das Claviceps-Fragment wurde in das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors pBR325 eingebaut – findet man einen DR von 5 bp. Der Abstand zwischen den Kopien des DR beträgt 125 bp. Die erste Kopie des DR liegt direkt vor der Klonierungsschnittstelle. Die letzten drei Basen der Wiederholung "TTTACG" gehören schon zu der Klonierungsschnittstelle "CAGCTG" (PvuII). Geht eine Kopie des DR während der Replikation mit zweiten eine Paarung ein, bildet sich eine einzelsträngige Schlaufe. Entweder bei einer weiteren Replikationsrunde oder durch Abspalten der Schlaufe, entsteht eine Deletion, die eine Kopie des DR und die Sequenz zwischen dem DR umfaßt. Für einen solchen Mechanismus während der Replikation gibt es Beispiele (Moore 1983, Brunier et al. 1988). Dabei würde die Klonierungsschnittstelle nicht zerstört, so daß unklar wäre, ob die Deletion vor oder nach der Klonierung des Endfragmentes von pClK1 passiert ist.

Setzt man voraus, daß ein solcher Mechanismus zu den fehlenden Basen des Hybridplasmides pPKE2 geführt hat, ist die Endsequenz beider rechter Endklone gleich.

Das Hybridplasmid pPKE2 ging aus einer Klonierung hervor, in der Gesamt-mtDNA eingesetzt wurde (mtDNA, pClK1, pClK2, pClK3) (Düvell 1988). Um zu prüfen, ob das Hybridplasmid pPKE2 ein Endfragment von pClK1 und nicht eines des zu pClK1 kollinearen pClK2 enthält, wurde der ganze Insert von pPKE2 sequenziert: ein EcoRI-Fragment von 1,05 kb. Der Vergleich mit der entsprechenden Sequenz des Hybridplasmides pPKH1 ergab eine 100%ige Übereinstimmung. Folglich ist es sehr wahrscheinlich, daß pPKE2 ein Endfragment von pClK1 trägt. Es sei denn, die Sequenz vom Plasmid pClK2 leitet sich vollständig von der des Plasmides pClK1 ab (s. Kap.1).

Ein Vergleich der sieben vorhandenen linken Endklone zeigt, daß fünf die gleiche Sequenz enthalten, während einem eine und einem anderen Klon fünf Basen fehlen. Fünf von sieben linken Endklonen zeigen damit die gleiche Sequenz.

Da die beiden Enden von pClK1 einen TIR bilden, sollten die Sequenzen beider Seiten – vom 5'-Ende aus betrachtet – mit dergleichen Base beginnen. Dies ist der Fall, so daß die Wahrscheinlichkeit, die gesamten Enden des nativen Plasmides kloniert vorliegen zu haben, groß ist.

Das lineare 11,6 kb Plasmid von Brassica besitzt einen TIR und vermutlich 5'-terminal gebundene Proteine. Um seine vollständige Klonierung nachzuweisen, hat man versucht, die Enden nativ zu sequenzieren. Ein synthetisches Oligonukleotid, das innerhalb des TIR gelegen war, diente als Primer für eine Didesoxysequenzierung. Doch offenbar war es nicht einfach, das Plasmid aus der Pflanze sauber zu isolieren, da man nur einen Abbruch der Sequenzleiter in dem erwarteten Abstand zum Primer beobachten konnte (Turpen et al. 1987).

Um eine vollständige Sequenzierung eines linearen Plasmides glaubhaft zu machen, ist eine native Sequenzierung von Plasmid-Enden ebenso beweiskräftig wie eine Statistik der Sequenz von klonierten Endfragmenten. Ein

Abb.2 zeigt die Sequenzierungsstrategie für das Plasmid pClK1 und Abb.3 die resultierende Sequenz von pClK1. Die nächsten Kapitel werden sich mit der Analyse der 6752 bp langen Sequenz befassen.

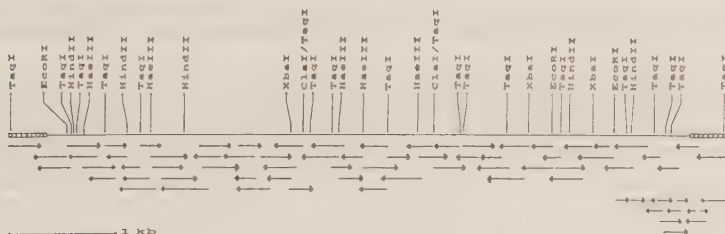


Abb.2
Sequenzierungsstrategie für das Plasmid pCIK1. Unter der Restriktionskarte des Plasmides pCIK1, in der für Klonierungen benutzte Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen aufgeführt sind, stellen Pfeile Richtung und Länge der einzelnen ermittelten Nukleotidsequenzen dar. Mit der Plasmidsequenzierung bestimmte Sequenzen sind direkt unter der Restriktionskarte gezeichnet. Mit der Maxam und Gilbert-Methode ermittelte Sequenzen sind unten rechts zu finden. Der TIR von pCIK1 ist gekennzeichnet.

GAGAGAGCAAGCGTTTCGATATATGCCCTTTTTTCGGGACCCCTAAGAGAGAGAAATTTCGACACCTTGATGGCTCTCCACGGTTTTACCGTTAAATGCTTTTGATTAAATTATGACT 120
CTCTCTCGTCAGCAAGACTAATATACGGAAAAAGCGCTGGGATATTCTCTCTCTTAAACGATGGGAACTACACGAGAGAGTGCCAAAATGGCAATTACGAAAACTAATTAATACTGA
TGGTTCGTTTGTAGATACTAGCTTTTTGCTGCTACTATTAAATAGTCTCTTGCTTAATACCAAAATTCCTGATTCAGGTCGGATGGAATTTTACTATGTTAAATCTTTTACTACATCAAC 240
ACCAAGACAAATCTATTGATCGAAAACGACATGATTATTATCAAGAAACGAATTTATGGTTTAAAGGACTAAAGCTCAGGCTAATCTAAAAATGATACAAATGAAGAAATGATGTTATGTG
GTTCTTAACCCCTTGGCTAACTAATTTATTAGAAAAAAGCTGGCACAGGCTTGGGTTAAACTTTCCGCTAAAAACCGGACGCTTGTGCTTGCATGGTATGGGCGTTAGATTCTATCT 260
CAAGATTGGGAACGGATTGATTAAATAATCTTTTGTTTGCACGGTGCCCAACCCAAATTTGAAAGGCGATTTTGGGCGTCGCAACAGAGCGTACCAATCTGGCAATCTAAGATAAAG
ACATATGCTTCGGCCAAAACCACTACTACTCTTTGGTTACTAAGTCCCTTAAACCAAAGCTACTACTATGGTTACCAAGTCACCGTTCATCTTTTGCACACCTTCAGGAGCGTTTACAG 480
TGTTTACAGAAGCGGTTTTGGTGATGATGATGAACCAATGATTACGGGATTTGGTTTGGATGATGATACCAATGGTTTCACTGGCAAGTAAAGATGTGTGGAGCTCTGAAAATGTC
AACAAACCTTTTAATCGTGATTTACAAGTTGAATTGAATCTTTTATGATTAATCAGGTTAACTTTTAAATACAAGATCATAGTATGGGAAGTGATTTGAATTAAGCTTAACAGTACT 600
TTGTTTGAGATATTACGACTAAATGTTCAACTTTAACTTTGAAAAAATCTATTAGTCCCACTTAAGGATTTATGTTCTAGTATTCTATACGCCCTTCAGCTAAACTATTATTCAATGTGATGA
ATCAACAATATTGTTTTCGATTAAGCTCGAGATCATGAAGAATATTAACTAAACTAAAAAAGAGTTTAAATAAGGCTCTTGGCTTAAATGAAGGAAGTACTACTATGAAGAAAAATAC 720
TACTGTTTATAAACAAGCTATTTCGACTCTAGTACTTTTTCATAAATGATTGATTATTTTCTCAAAATTTATTCGAAGACCGGAATTATTCTCTGATGATGATGATCTGTTTGTGAG
GACTATTTAGCTTATCTAGTATTGGCTAAAGTCACTCTCGGTGGTAGTAGTTGGGCTGATGCTATATATCTTCTCTTACTGTTGTTTACTATCCGAATATATATACAGATGATAAGTGGCAT 840
CTGATAAATCGAATAGATCATACGCCATTTCACTGAGGACCACTCATCAACCCGACTACGATATATAGAAGGAGAAATCAACAATGTATAGCTTTATATATAGTCTACTATTTCACGGTA
ACTGGAGCTACTATTATAAATATTAAATGGGGAAGCTAATAGTCGATAAGTATATTCAAGCTCTAAAGGGAAAAAGACATATATCTCTATCTTTATGTCCTGATCTTATTAGTAGTA 960
TGACCTCGATGATATATTTTAATTAATTTACCCCTTCGATTATCAGCTATTATCAAGTTCGAGATTTTCCCTTTCTGTGTAATATAAGATAGAAATACAGGCTCAAGAAATATCATGCT
GACGACAAATATGTTCTTTGATGATGCTTTCTATTTCATTTAGGAGCTTAATACTAAGAAATATTGGAATCCGATCTTTTGGCTCTAACTCTCGTGAAATTAAGGATGAGAGTAC 1080
CTGATGTTTTCACGAAGAACTACTACGAAGAATAAATGAAATCTCGAATTTGATTATCTTTTAACTAACTATAGGCTAGAAACACGAGATTGAGAGCACTTTAAATTCCTACTCTCAGTA
TTTTTTTGGAGATTTTGGGATGATGATGAACCAATGATTACGGGATTTGGTTTGGATGATGATACCAATGGTTTCACTGGCAAGTAAAGATGTGTGGAGCTCTGAAAATGTC

TCGGTATTACGTTAACTGGAAGAAGTGCTTAAAGCTATACCTACTAACAAAGTAGTCTTAGCTCCTTTAAAATTACCTATGATCGTAGCTCCTAACCATATAGTAAAGAGGAACACGG 1200
AGCCATAATTGCAATTGACTTCTTCACCGATTTCGATATGGATGATTGGTTTCACAGAACTCGAGGAAAAATTTTATGGATACCTAGCATCGAGGAATTTGGTATATCATTTCTCCTTTGGCCCT

GGCTATTACTAGCAAGATTTCGATTACTTATAGATAGTCTTCACTAAGAAAGTTGAATATGAATGATATTTCAAGAATACAGGAGAAGAACATTATCTACGAATCTATTAAACAGATGAT 1320
CCGATAAATGACTTGGTAAAGCTAATGAATCTATCAGAAGATTGATTCTTCAACTTATACCTTACTATATAAGTCTTATGTGCTCTCTTGTAAATAGATGCTTAGATAATTTGTTCTACTAC

HaeIII

GCCTCAGCGCTCCCAATAAATAAAAGCTACTTAAATATTTATTAGAAATTAAGTATTTCAGCAAGCTCTTGAAGCTGGAAGGTGACGATCTATAAAAAACATAACTCAAAATTAGATAT 1440
GGTGTGCGCAAGGTTTATTTATTTTCGATGAATTTATAAATAATCTCTTAATGCATAAGTCGTCGAGAACCTCGACCTTCCACTCTAGATATATTTTGTATTGAGTTTAACTCTAT

GATAATATGGACAAAAGAGATAATCAAAAATATCAACAATATTTAAGTCAGAAATTAAGTATAGAGCTATATTTAGATATTTGGCAGTCTCTTTCAAAATGTGCGCAAGACTATATTTCCCT 1560
CTATTATACCTGTTTCTCTATTAGTTTTTATAGTGTGTATAAATTCAGTCTTAAATGAATCTCTGATATAATATCTATAACGCTGACAGAAAGTTTTACACGCTCTGATATAAAGGA

TTGAAGTTAGATCAGACAGGTCGCTTTTATCCATTACGGCTTACTTTCTTACCAGAGTAGTGAGTTAGCTAAAGCTTTATTATTGTTTGGTATTCCAGATACTATAGAGAGATCGAT 1680
AACTTCAATCTAGTGTCTCCAGCAGAAATAGGATAATGCCGAATGAAAGTAATGGTCTCATCTCAATCGATTTTCAAAATAATAACAAACGATAGGCTTATGATATCTCTCTAGACTA

AGTATTTCAATAGACTATTTAAAGCATATGGCGCTTCTGCTTTGGGAATAAGTTAGATAAAAGCTCTTCAGATAAAGATTACAATGGTAGAGTCTAACTGAGAAAACATTATCAAT 1800
TCATAAGGTAATCTGATAAATTTTGGTATACCGGTAAGCAGAAACCTTATTCAATCTATTTTTCAGAACTGATTTTCTAAATGTTACCCATCTACGATTGACTCTTTTGTAAATAGTA

TACAGAAATAATGCTTATTAGAACTACGAGAAAACAAATTCATGTTTCTAGCTTACTGCTGGAGATTGACAGATTAATCAATTTTCTAACGATGATTCTATTGAAAACCTTTAAACCT 1920
ATGTCCTTTATACAGAAATATCTTGATCGTCTTTGTTTAAAGTACAAAGATCGAATGACAGACCTCAACTCTCTAATTTAGTTAAAGAAATGCTACTAAGATAAATTTTGAATTTTGA

TATCTTCCCTTCAACCTTGACGGTACATGTAATGGATTTCAGCATATAGTCTTATTATCTTAATGAAGTAAAAATTATATAGTCAACTAAAACCTTGATGGCGAAGTCTAAGAACCAGATCCA 2040
ATAGAAGGAATGTGGAACGCCATGTACATACCTTAAAGCTGTATATCAGAAATATAGATTACTTCATTTTAAATATATCAGTGTATTGGAACCTACCGTTGAGATCTTGGTCTTAGGT

TCTGATTTTACAGGCTTTATGATAAATCAGTTAAACATCCATCTGCTCAACAAAAGAGCGTAAGTACAGACAGAAGATATAGAGTCATATGACAGATTGATTAACTAGGTCTTTCT 2160
AGACATAAAATGTGCAAACTACTATTAGTCAATTTGATGGTAGACGAGTCTGTTTTCTGCTCATCTGCTGCTTTCTTCTATATCTCAGTATCTGTCTAACTAATGGATCCAGAAAGA

AGGGCTAATATAAAACAAAGCTATCAGCTAAACCTTATAAGCTAAAGATTTTACTGTAGCTAAATATATAAAGAAACCTTATTAAATAGCTAGTGAGGATAAATATATAGACGAAA 2280
TCCGATTTATATTTGTTTCGGTAGTACGTATTTGGGATATTGGGATTTCTAAATAGCATCGATTATATATATTATCTTTGGAATAAATATCGATCACTCTATTTATATATCTGCTTTT

GGTATAACTAGAACCGAGTGTGATATAAGGTTAATGAGACTATCAGTAAACGTTGCGCTGCTTTAGAGATATCTATCTATTAGCGAAGTGCATAAATGAAATACTATTCTTAAATATCCG 2400
CCATATTGATCTTGGCTACACACTATTTCCAAATTAAGTCTGATCTGATGTCGACAGCGAGAAATCTCTATAGATAGATAATCGCTTCAAGTATTTACCTTTATGATAAGGAATTAATAGGC

CAGATAAAGTCGTTATTGGAATATTTAAACAGTATCAGTGAGATTATGCTTAAATTAACCTTCCAATCACTTGAAGTCTACCGACTGGTTTGAAGGTTCACTAGCAATATCATGAGGCT 2520
GTCTATTTTCAGCAATAACCTTATAAATTTGTCTAGTCACTCTAATAGCAATTTAATTTGGAAGGTTAGTGAACTTCAGATGCTGACCAANTCTCAAGTAGTCTTATGATCTCCAGA

AAAGCTAAAAAGACTAAACCTTTATACATATTTAGATACCTTCTTACGCTTAAATTTACGGACAAAAATTTAAATGGATAAAGTAAACAAACAGATTGCACTTAATGCGCTAATCTGATACAT 2640
TTGCTATTTTCTGATTTGGAATATGTATAAATCTATGGAGGAACCTGCGAATTTAATGCGCTGTTTAAATTTAACCTATTCAATTTTGTGCTCAACGTGATTACGGATTAGACTATGTA

TCTCTAGATGCTGCTTCACTAATAATGTTGTATTTTGGCTTTTAATAAATCTATCGGTTCTGGAGTTGTAACCTCTATAGCGTTCTATGACTGTTACGGGGTTACTGCTAAATATATCGAT 2760
AGAGATTCTACGACGAAGTGATTATTACACATAAAACGAAAAATTTATAGATAGCCAAAGCTCAACATTTGAAGATATCGCAAGTACTGACATGCGCCCAATGACGATTTATATAGCTA

CTTCTAATATCTCAGCTTAGAGAGCTCACTTGAATTTGATCTCTAAGAGCGTTATATGCTCATTTTCCGATGTTGATATCATAAATCAAAATTCGTAAGGCTTATACATAAAGAAAGAC 2880
GAAGATTATAGATCGAATCTGCTCAGATGTAACCTTAACATGAGATTTCTGCCAATAAACAAGTAAAGCTCAACATATAGTATTAGTTTAAAGCATTCGGAATATGATATTTCTTCTC

ATTTTACCTATGATCATAAAAATAGATTAATCTCCATCAACGAAAAATATCATAGTGTACCTCCAATTTCTAACATCGGTAATCAAGAGCACATACGTAAGCGGTATGAAAGATTAGCT 3000
TAAAAATGGATACATGATTTTATTCTCATTAGAGTAGTGTGCTTTATAGATATCAGATGAGGTTAAAGGATTGTAGCCATAGTTCTCGTGATGCAATTCGCATACTCTTAAATCGA

HaeIII

AAACGGAATATGTTTATTAACTAACTCTGACTCGAGATTTTACAGTTATTATATTACTTTAACGAGGAGTATCTTAACTGCATGCAAAACCAANTATGGCCCGGTAGCTAGAGCTTT 3120
TTTCGGTTATACAAATAATTCATTGGAGACTGAGCTCTTAAATGTCATAATATAATGAATTTGCTCTCATAGAAATGACGATAGCTTTTGGTTATATACCGGGGGCATCGATCATCGAAA

TTCTAAAAATCAAGACGACCCCGGTAGCTCTATACAGTTATCTAGATAGCTGTTTTTTTTGCTTCAACAGACAAACCGGTAACCTAGAAAACACTAGACAAACCCCGTAATTTCTA 3240
AAGATTTTATGTTCTGCTGGGGCATCGAGATATATGCTAATAGGATCTATCGACAAAAAAAACGAAGTGTCTGTTTGGGCAATGATCTTTTGTGATTTCTGTTTGGGGCATTAAAGAT

HaeIII

TTGTAGAAAAATAAATGTAAAGGAGCAACCTGAACCCAGACAAACCTGTAGCCTTAAAGAAAAAAAATGCCAAGCTTTTACACTTGGCCAAAAACATTTCGTTTATTAGTTTGT 3360
AACATCTTTTATTATCATTTTCTCTGTTGGACTTGGGTTCTGTTTGGGACATCGGATTTCTTTTTTTTTTACGGTTGCAAAATGTGAACCGGTTTTTGTAAAGCAAAATAATCAAAAC

EcoRI

ATCAGTATGTACTCTGACGCTCTTTTACTAGTATAAAGACTACACAGTATCAGCAATTTGGTATTTTAAATTTCTCTAGGACTAGGCATAAAGAGTGTCTGGTTAACTCTCTGTTG 5160
TAGTGATACATGAGAGATGGAGAAAATGATCATATTTCTGATGTCATAGTGTCTTAAAGCATAAAAATTAAGAGAAATCTGTGTCGTTATTTCTCAACAGCAATTTGAAGACAAAC

AACTCCAATTAATCAGGATTAATCGGTTATAAATCCATTCAGTCTATCGACCTGAGTACTATAGTATCTCTTTTATTTAGATTTATTTGGTGTGACACCTTACGAGGCTCAAAGCCCCCT 5830
TTGAGGTTATTAGATCTANTAGCCAAATATTAGGTAACTCAGATAGCTGGACTCATATCATAGAGAAAAATAAATCTAAATAACCAACACTGTGGAATGCGTCCAGTTTCGGGGGA

ATTAGATTTGAATACACTCAATCTCTGTCGAAAAGCTTTGGTGCTAATTTTCTTTGCGATCCTTAAGGTTAGAGATTTGATTTCTCTAGGTTGTACAGATGAACCTCAAGAGTAAG 6000
TAATCTAACTTATGTGAGTAAAGACAACGTTTTTCAGAAACCAAGATTAAAGAAAGCGTAGGAATTCCTAATCTCTAAAACATAAAAGAGTCCAGACTGTCTCATTTGAGGTTCTCATTC

GGCTCACATGTATATTCAAGTCTCGTAGGATCTCCTCAATAGTATAGCAAGCTCTATCTATTATAGTATCAAAACCTTCGAGTAGAATGATCTGGATATCTACAAAATAGGACACCA 6120
CGCAGTGTACATATAAGTTGAGGACCTCTATGAGGAGTTTATCATATCGTTCAGATAGATAATATCATAGTTTGTGAAAGCTCATCTTTACCTAGACCTATAGATGTTTATCTCTGTTG

ATCTGTCTATCTCTCATAGTATAGAAATTTATTTCTTTACGGACCTTCAACAGCAAGGCTAAGTATATTGGAATAGGATCTTATTATCGAAAAAGAGATGGGAAAAGAACTTTGCAAAA 6420
TAGACAGATAGAGGATATCATATCTTAATAAAGCAATGCTCGAAATGCTGCTGCTGCTATTCATATAAGCTTATCTTAAGATATAAGTCTTTTCTCTACGCTTTCTTTGAAAGCTTTT

TCTCTATCTACGAAAAATCATATTGATCTCACTCTGTTGATACGGTCTTTTATTTTCAATGAGTTTGTATAGGCTGAAGTAGAATAAATCTAAGCTCTCTATAAAGTCTCCAGT 6360
AGAGATAGATGCTTTTATAGTATAAGTAGGAACCAACTATGCGAGAAATAAAGTTACTCAAAAACATCTCCGACTTCATCTTATCTTAGATTGAGAGATATAATTTCAAGAGTTAC

CCCATACCAACGACAGCAAGAGCTGCTTTTTTAAGTTCACACGCTTTCTTTGTTGAGCTAAAGTAAGACGTCGGGTTTTAGCGGAAAGTTAAACCAACAGCTGTGCGAGTTTGGTTT 6480
GGGTATGGTGGTCTGCTTCTGTCAGCAAAAATTCAGAGTATGCGAGAAAGAAACCACTGATTTTCATCTGCAAGCCCAAAATGCGCTTTCAAAATGGGTTGTGACACGGTCAAAACAAA

TCTAATAAATAGTTAGGCAAGGGTTAGAAACGTTCTATTGTAGTAAAGAAATTAACATAGTAAAAATTTCAATCGGACCTGAAATCAGGAAATTTGGTATTAGCAAAAGAACTATTATA 6600
AGATTATTAATCAATCGTTCCTCAATCTTTCGAACATAACATCATTTTCTTAATGTATCATTTTTTAAGTTAGCGTGGAGCTTTAGTCTTTAAACCTAATTCGTTCTCTGTAATTTAT

GTACAGCAAAAGCTAGTATCTAAACAGAACCAAGTCAATTAATCAAAAGCAATTTAAAGCTAAACCGTGGAGAGACATCAAGGGTAGCAAAATTTCTCTCTCTATAGGGTGGGAAA 6720
CATGCTGTTTTGATCTAGATTTCTCTGTTGCTAGTTATTAATGATGTTTCTGTAATTTGCAATTTTGGCACTCTCTCTGAGTAGTTCCTATCGTTTAAGAGAGAGATAATCCGACGCTTT

AAAAGGCATATAATCGAAACGACTGCTCTCTC
TTTTCCGTATATTAGCTTTGCTGACGAGAGAG

Abb.3

Nukleotidsequenz des Plasmides pClK1 (*C. purpurea*, Stamm K). Zur Orientierung sind die EcoRI- und HaeIII-Schnittstellen gekennzeichnet.

3.2 Analyse der pClK2/3-Übergangsregion

Zusätzlich zu pClK1 besitzt der Stamm K noch zwei weitere Plasmide - pClK2 und pClK3, die zu pClK1 kolinear sind und in weit geringerer Konzentration auftreten. Die Kolinearität von pClK3 (1,2 kb) reicht vom linken pClK1-Ende bis zur näheren Umgebung einer Sau3A-Schnittstelle (1161-1164 in Abb.3), die von pClK2 von dort bis zum rechten pClK1-Ende. Es gibt keinen Hinweis darauf, daß sich die beiden Plasmide pClK2 und pClK3 überlappen. (Düvell 1988)

Da es sich bei pClK2 und pClK3 offensichtlich nicht um Aufarbeitungs-Artefakte handelt, wurde der Grenzbereich, in dem beide Plasmide vermutlich aneinander stoßen, auf Strukturauffälligkeiten hin untersucht.

Die Ansicht, daß pClK2 und pClK3 keine während der Präparation auftretende Artefakte darstellen, gründet sich auf folgende Beobachtungen (Düvell et al. 1988):

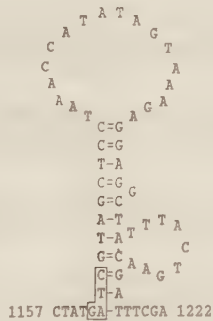
- 1) Variationen der Aufarbeitung führen nicht zu veränderten relativen Verhältnissen der drei Plasmide des Stammes K zueinander.
- 2) Reindargestelltes Plasmid pClK1 zerfiel nie in die beiden kleineren Plasmide pClK2 und pClK3.
- 3) Der *Claviceps*-Stamm Bay4 besitzt ein von pClK1 durch Restriktion nicht unterscheidbares Plasmid pClB4, aber keine den beiden kleineren Plasmiden entsprechende Moleküle.

Als Grenzbereich wurden 100 Basen vor und hinter der Sau3A-Schnittstelle definiert und einer Untersuchung unterworfen. Die Region fällt weder durch einen besonders hohen AT- noch GC-Gehalt auf.

Das Plasmid pClK1 hat einen AT-Anteil von 67%. Sein AT-Anteil entspricht in etwa dem der hmw mtDNA, da in einem CsCl-Gradienten die Plasmide und die hmw mtDNA bei gleicher Dichte bandieren (Tudzynski et al. 1983).

In der Region findet man mehrere mögliche Sekundärstrukturen. Um die Signifikanz der Sekundärstrukturen zu prüfen, wurde ihre freie Energie nach Tinoco et al. (1973) berechnet. Es ist unwahrscheinlich, daß eine mögliche Sekundärstruktur, die einen positiven oder nur geringen negativen Betrag ihrer freien Energie aufweist, auch ausgebildet wird. Nur eine der gefundenen Sekundärstrukturen besitzt einen deutlich negativen Wert ihrer freien Energie (s. Abb.4).

Abb.4
Mögliche Sekundärstruktur, die innerhalb der pClK2/pClK3-Übergangsregion des Plasmides pClK1 liegt. Ihre freie Energie beträgt nach Tinoco et al. (1973) -8 kcal/Mol. Die dort vorkommende Sau3A-Schnittstelle ist umrandet.



Position	Sequenz	Größe/bp
1087-1096	TTAACGTTAA	10
1104-1125	AGTGGCTAAAGCTATACCTACT	22
1157-1168	CTATGATCCTAG	12
1172-1189	CTAAACCATATAGTAAAG	18

Tab.2
Sequenzen mit Palindromcharakter, die innerhalb der pClK2/pClK3-Übergangsregion des Plasmides pClK1 liegen und nicht in einem anderen Bereich von pClK1 auftreten. Nicht perfekte Bereiche der Palindrome sind durch Unterstreichen der betreffenden Basen markiert.

Als drittes wurde nach Sequenzen mit Palindromcharakter gesucht, da diese auf eine Proteinbindestelle hindeuten können. In Tab.2 sind solche Sequenzen aufgeführt, die größer bzw. gleich 6 bp groß sind, die ein perfektes oder nahezu perfektes Palindrom bilden und die nur einmal im Plasmid pClK1 vorkommen. Mehrfach vorkommende Palindrome wurden übergangen, da Strukturen des Grenzbereiches vermutlich nur singulär vorkommen, wenn sie in Zusammenhang mit dem Entstehen von pClK2 und pClK3 stehen sollten.

3.3 Analyse des "terminal inverted repeat" (TIR)

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, Southern-Analyse und den Vergleich der Feinrestriktionskarten beider Enden wurde nachgewiesen, daß das Plasmid pClK1 einen TIR von ca. 300 bp besitzt (Tudzynski et al. 1986, Düvell et al. 1988). Die genaue Länge des TIR beträgt 327 bp (s. Abb.5). Zusätzlich zum TIR gibt es zwei 16 bp große Sequenzregionen, die in der Nähe des TIR gelegen sind und zueinander inverse Homologie besitzen (s. Abb.6) (Düvell et al. 1988).

```

linkes Ende 1 5' GAGAGAGCAGTCGTTTCGATTATATGCCCTTTTTTCGGGACCCCTATAAGAGAGAGAATTTGCTACCCCTGATGGTCTCTCCACGG
rechtes Ende 6752 5' GAGAGAGCAGTCGTTTCGATTATATGCCCTTTTTTCGGGACCCCTATAAGAGAGAGAATTTGCTACCCCTGATGGTCTCTCCACGG
*****

TTTTACCGGTAAATGCTTTTGATTAAATTATGACTTGGTTCTGTTTAGATACTAGCTTTTGCTGTACTATTAATAGTCTTTTGCTTAATACCAAAATTTCCGTGATTT
TTTTACCGGTAAATGCTTTTGATTAAATTATGACTTGGTTCTGTTTAGATACTAGCTTTTGCTGTACTATTAATAGTCTTTTGCTTAATACCAAAATTTCCGTGATTT
*****

CAGGTCGGATTGAAATTTTACTATGCTTAAATCTTTTACTACAATACACGTTTCTTAACCCCTTGCCCTAACTAATTTATTAGAAAACAAAACGGCACAGGTGTTGGG
CAGGTCGGATTGAAATTTTACTATGCTTAAATCTTTTACTACAATACACGTTTCTTAACCCCTTGCCCTAACTAATTTATTAGAAAACAAAACGGCACAGGTGTTGGG
*****

TTAAACTTTCCCGCTAAAACCCGACGCTCTTCTCTGCATGGTATGGGCGTTAGATTCTATTCTACATGTCTTCGGCCAAAACCACTACTACT 3' 399
TTAAACTTTCCCGCTAAAACCCGACGCTCTTCTCTAGCTCAACAAGAAAGCGTAGTGAACCTAAAAAGCAGCTCTTGCCTCTGGCGGTATG 3' 6363
*****

```

Abb.5

TIR des Plasmides pClK1. Gezeigt ist die Nukleotidsequenz des linken und rechten Endes. Identische Nukleotide sind durch Sternchen markiert. Das letzte Basenpaar des TIR ist umrandet.

linkes Ende



rechtes Ende



Abb.6

Nukleotidbereiche hinter dem TIR von pClK1, die zueinander inverse Homologie zeigen.

TIRs sind nicht nur ein Charakteristikum der Claviceps-Plasmide, sondern alle daraufhin untersuchten linearen Plasmide zeigen dieses Strukturmerkmal. Die TIR-

Sequenz von pClK1 wurde mit den TIRs linearer Plasmide verglichen, von denen die Sequenz veröffentlicht ist:

- pSLA2, 614 bp, Streptomyces rochei (Hirochika et al. 1984)
- pGK11, 202 bp, K. lactis (Hishinuma et al. 1984)
- pGK12, 182 bp, K. lactis (Hishinuma et al. 1984)
- pSKL, 483 bp, Saccharomyces kluyveri (Kitada und Hishinuma 1987)
- S1, S2, 208bp, Z. mays (Paillard et al. 1985)
- 11,3 kb Plasmid, 325 bp, Brassica (Turpen et al. 1987).

Dabei wurde nicht unbedingt erwartet, daß zwischen ihnen größere Sequenzhomologien bestehen. Die TIRs der gemeinsam auftretenden Plasmide pGK11 und pGK12 (K. lactis) besitzen keine ausgedehnten Sequenzhomologien (Hishinuma et al. 1984). Allerdings gibt es zwischen den endständigen Basen einiger Mais-Plasmide bzw. zweier Hefe-Plasmide eindeutig Homologien (Bedinger et al. 1986, Kitada und Hishinuma 1987), deren Bedeutung eventuell mit der Replikation dieser Moleküle zusammenhängt.

Die ersten 16 Basenpaare des 208 bp großen, zwischen dem S1 und S2 Plasmid (Z. mays) identischen TIR besitzen hohe Homologie zu den ersten 16 Basenpaaren eines ebenfalls in Z. mays vorkommenden linearen, mitochondrialen 2,3 kb Plasmides. Eine ähnliche Situation findet sich bei den TIRs der Plasmide pGK11 (K. lactis) und pSKL (S. kluyveri).

Der TIR von pClK1 zeigt weder ausgedehntere Sequenzhomologien zu einem der aufgelisteten TIR noch zu endständigen Basen derselben.

Für verschiedene TIRs sind strukturelle Auffälligkeiten beschrieben:

- 1) Der TIR von pSLA2 (St. rochei) besitzt etliche nahe beieinanderliegende, kurze Palindrome (Hirochika et al. 1984).

Auf Grund der Palindrome wurde ein "racket frame"-Modell vorgeschlagen, in dem die Palindrome spezifische Proteine binden. Durch die Proteine – so die Hypothese – werden die TIRs beider Enden zusammengehalten. Die gesamte Struktur wird als Vorstufe einer möglichen Insertion linearer DNA-Moleküle mit TIR in genomische bzw. bei Eukaryonten auch in die Organellen-DNA vorgestellt. Allerdings konnte für pSLA2 selber keine Integration nachgewiesen werden.

- 2) Ein Sequenzmotiv von 30 bp wird achtmal innerhalb des TIR von pSKL (S. kluyveri) wiederholt (Kitada und Hishinuma 1987).
- 3) Eine 16 bp große Sequenz mit Palindromcharakter findet sich in den identischen TIRs von S1 und S2 (Z. mays) (Scharl et al. 1985).

Ihr wird eine Rolle in einem Rekombinationsereignis zwischen S2 und der hmw mtDNA zugeschrieben.

Um die Verbreitung dieser Strukturmerkmale zu prüfen, wurden alle sequenzierten TIRs von linearen Plasmiden (s.o.) daraufhin untersucht. Dabei wurden die Rahmenbedingungen so gewählt, daß auch weniger ausgeprägte, den hier geschilderten Strukturmerkmalen jedoch gleichende erfaßt werden mußten.

Die Besonderheiten von pSLA2 (St. rochei) und pSKL (S. kluyveri) konnten bei den anderen Plasmiden nicht gefunden werden. Kleine Sequenzen mit Palindromcharakter gibt es in jedem TIR (s. Tab.3). Ihre Sequenzen besitzen miteinander allerdings keine Ähnlichkeit - auch ist ihre Entfernung vom Plasmid-Ende verschieden.

Plasmid	Organismus	Position	Palindrom-Sequenz	Länge/bp
pSLA2	St. rochei	215-238	GGG <u>CCGTC</u> CGCGCGCGCGGACCC	24
		451-466	GGCGCGCGCGCGCACCC	16
pGK11	K. lactis	168-181	TGACCTATAAGTCA	14
pGK12	K. lactis	32-47	TTTTTAAGCTAATAAA	16
pSKL	S. kluyveri	7-22	TATAGATATAGATATA	16
S1/S2*	Z. mays	140-155	ACCCTCTCCGGAGAACT	16
11,3 kb	Brassica	10-21	AAACTATAGCTT	12
pClK1	C. purpurea	151-162	ACTATTAATAGT	12
		252-275	TTG <u>CTCAACT</u> AATTTATTAGAAAA	24
*Die Palindrom-Sequenz im TIR von S1 bzw. S2 wurde von Schardl et al. (1985) gefunden.				

Tab.3

Sequenzen mit Palindromcharakter innerhalb des TIR von linearen Plasmiden (Referenzen s. TIR-Liste auf S.19). Nicht perfekte Palindrome sind durch Unterstreichen der betreffenden Basen markiert.

	Position	Sequenz
pClK1 (<u>C. purpurea</u>)	19-28	ATTATATGCG
Ad4 (Mensch)	9-18	ATAATATACC
SA7 (Affe)	9-18	ATAATATACC
ICMV (Hund)	9-18	ATAATATACA
EAd (Pferd)	9-18	ATAATATACA
BAd1 (Rind)	9-18	ATAATATACG
AdF1 (Naagetier)	9-18	ATAATATACA
TSAd (Spitzmaus)	9-18	ATAATATACC
CELO (Vogel)	9-18	ATAATAAGAC

Abb.7

Vergleiche der Basen 19-28 von pClK1 (C. purpurea) mit den Basen 9-18 des TIR von Adenoviren. Die Adenovirus-Sequenzen wurden einer Zusammenstellung von Shinagawa et al. (1987) entnommen.

Als letztes wurde die Homologie zu TIRs von Viren untersucht, die strukturell den linearen Plasmiden ähnlich sind (Linearität, TIR, 5'-gebundenes Protein). Für Homologien von TIR-Sequenzen zwischen Plasmiden und Bakteriophagen gibt es Beispiele in der Literatur (Levings III und Sederoff 1983, Bedinger et al. 1986, Turpen et al. 1987).

Die Plasmide S1 und S2 (Z. mays) und auch das 2,3 kb Plasmid (Z. mays) zeigen innerhalb ihrer ersten Basen eindeutig Homologie zu den kurzen konservierten TIRs von Bacillus-Phagen (Phi29, Phi15, M2, Nf und GA1). Am schwächsten ausgeprägt ist die Homologie zum TIR des Bacillus-Phagen GA1, zu dem wiederum die ersten Basen des TIR eines linearen mitochondrialen 11,3 kb Plasmides aus Brassica eine gewisse Homologie zeigen. Dem entspricht, daß innerhalb der Bacillus-Phagen selber der TIR zwischen Phi29, Phi15, M2 und Nf völlig konserviert ist, während der TIR

von GAI nur begrenzte Homologie zu den TIRs der anderen zeigt (Yoshikawa et al. 1985).

Das Ergebnis einer solchen Homologiesuche bei pClK1 zeigt, daß eine 10bp große Sequenz hohe Ähnlichkeit mit den bei Adenoviren konservierten Basen 9-18 ihres TIR hat. Bei den Adenoviren des Menschen ist diese Sequenz für die Initiation der Virus-Replikation unbedingt nötig (Campbell 1986, Guggenheimer et al 1984, Rawlins et al. 1984). Die Sequenz besitzt darüberhinaus einen ähnlichen Abstand zum Ende (s. Abb.7). Ihre Bedeutung in Bezug auf die Replikation des Plasmides wird diskutiert.

3.4 Analyse der Codierungskapazität

Um die Codierungskapazität von pClK1 zu klären, wurde die Sequenz den üblichen Analysen unterworfen: Vergleich mit RNA-Molekülen, Suche nach möglichen URFs und Vergleich der möglichen URFs mit bekannten Proteinen. Des weiteren wurde untersucht, ob das Ergebnis dieser Analysen mit Transkriptdaten von pClK1 (Düvell 1988) in Einklang steht.

3.4.1 Homologie zu RNA-Molekülen

Ein Vergleich von pClK1 mit allen RNA-Molekülen der GenBank (Genetic Sequence Data Bank) wurde durchgeführt. Es wurden keine Homologien gefunden.

3.4.2 Suche nach URFs

Um mögliche Translationsprodukte von pClK1 zu finden, muß man beachten, daß pClK1 ein mitochondriales Plasmid ist. Der genetische Code von Mitochondrien weicht vom universellen Code ab. Bei filamentösen Pilzen scheint die Abweichung auf das TGA-Codon beschränkt zu sein. TGA fungiert nicht als Stopp-Codon, sondern codiert für die Aminosäure Tryptophan (Fox 1987). Da bislang von C. purpurea keine mitochondrialen Gene sequenziert wurden, war unklar, ob auch hier die gleiche Variation des universellen Codes vorliegt.

Deshalb wurde das Hybridplasmid pKE10/1, das ein internes Fragment des COI-Genes der mtDNA von C. purpurea (Stamm K) trägt (Tudzynski pers. Mitteil... ar.-sequenziert (Oeser unveröffentlichte Daten). Das COI-Gen codiert für die Untereinheit I der Cytochrom c-Oxidase. Die beiden sequenzierten Endbereiche des 1,7 kb großen mtDNA-Fragmentes von C. purpurea sind nur unter der Annahme, daß TGA für Tryptophan codiert, jeweils in einen URF translatierbar. Der eine URF zeigt Homologie zum URF des Intron 2 des COI-Genes von Aspergillus nidulans und der andere zum URF des Intron 3 desselben Genes. Dem Intron 3 des COI-Genes von A. nidulans entspricht beim COI-Gen von Schizosaccharomyces pombe das Intron 2, das ebenfalls für ein Protein codieren könnte (Lang 1984). Alle drei Aminosäuresequenzen - URF des COI-Intron 3 von A. nidulans, URF des COI-Intron 2 von Sch. pombe und ein teilweise bestimmter URF eines COI-Introns von C. purpurea - zei-

gen Homologie zueinander. Dabei kommt die Folge "Trp Arg Lys Ala Tyr Leu" vor, wobei das Tryptophan bei allen drei filamentösen Pilzen von einem TGA-Codon codiert sein muß. Folglich darf man annehmen, daß der mitochondriale Translationsapparat des Mutterkornpilzes ein TGA-Codon nicht als Stopp-Codon, sondern als Tryptophan-codierendes Codon behandelt.

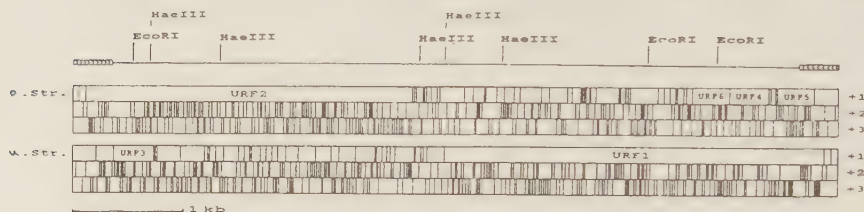


Abb.8

Lage der Stopp-Codone in den möglichen Leserastern (+1,+2,+3) des oberen (o.Str.) und unteren (u.Str.) des Plasmides pClK1. Die Lage möglicher Protein-codierender Regionen gekennzeichnet (URF1 bis URF6).

Beide Stränge des Plasmides pClK1 wurden in die drei möglichen Leseraster übersetzt, wobei TGA als Tryptophan-codierend vorausgesetzt wurde. Als möglicherweise Protein-codierend wurden nur solche Bereiche eingeschätzt, die größer als 300 bp waren und kein Stopp-Codon enthielten. Ein ATG-Codon (Methionin) zu Anfang eines URFs wurde nicht gefordert, da in *A. nidulans* zwei Protein-codierende Gene der hmw mtDNA nicht mit einem ATG-Codon starten (Waring et al. 1984, Brown et al. 1985). Unter diesen Bedingungen findet man sechs URFs: zwei große - URF1 und URF2, die beide innerhalb des TIR beginnen und vier kleine - URF3 bis URF6 (s. Abb.8). URF1, URF2, URF3 und URF5 besitzen in ihrem Anfangsbereich ein ATG-Codon. Im Falle des URF6 liegt ein ATG-Codon erst in seiner Mitte, und URF4 enthält kein ATG-Codon.

3.4.3 Homologie der pClK1-URFs zu bekannten Proteinen

Ein Vergleich der URFs von pClK1 mit der NBRF Proteindatenbank (NBRF = National Biomedical Research Foundation) diente dazu, über Homologievergleiche Informationen über eine mögliche Funktion der URFs zu finden.

3.4.3.1 URF1

Der Vergleich des möglichen URF1-Produktes mit den Proteinen der Datenbank ergab eine Homologie zu DNA-Polymerasen hauptsächlich viraler Herkunft. URF1 steht zu folgenden DNA-Polymerasen in Verbindung:

- DNA-Polymerasen von Eukaryonten:

DNA-Polymerase α (Mensch) (Wong et al. 1988) und DNA-Polymerase I (S. cerevisiae) (Wong et al. 1988, Pizzagalli et al. 1988)

- DNA-Polymerasen von Viren:

Vaccinia-Virus (Earl et al. 1986), Geflügelpocken-Virus (Bunns et al. 1987), Herpes-simplex-Virus (HSV1) (Quinn und McGeoch 1985), Varicella-Zoster-Virus (VZV) (Davison und Scott 1986), Cytomegalievirus des Menschen (HCMV) (Kouzarides et al. 1987), Epstein-Barr-Virus (EBV) (Baer et al. 1984), Adenovirus Typ2 (Aleström et al. 1982), Adenovirus Typ5 (Dekker und Ormond 1984)

- DNA-Polymerasen von Bakteriophagen:

Bakteriophage T4 (Spicer et al. 1988), Bakteriophage PRD1 (Savilahti und Bamford 1987, Jung et al. 1987b), Bakteriophage Phi29 (Yoshikawa und Ito 1982, Bernad et al. 1987)

- DNA-Polymerasen von Plasmiden:

URF1-Produkt des Plasmides pGK11 (K. lactis) (Stark et al. 1984, Sor und Fukuhara 1985, Jung et al. 1987a), URF2-Produkt des Plasmides pGK12 (K. lactis) (Tommasino et al. 1988), URF3-Produkt des Plasmides S1 (Z. mays) (Kuzmin und Levchenko 1987, Paillard et al. 1985).

Die Homologiebereiche zwischen diesen Polymerasen sind klein. Extensive Homologien gibt es nur zwischen DNA-Polymerase α und I (eukaryontischer Zellkern), zwischen den DNA-Polymerasen der Pockenviren (Vaccinia-Virus, Geflügelpocken-Virus), zwischen denen der Herpesviren (HSV1, VZV, HCMV, EBV) und denen der Adenoviren (Serotypen 2 und 5). Aus diesem Grund wird in Abbildungen und Tabellen nur jeweils ein Vertreter der vier Gruppen aufgeführt.

Zwischen allen aufgeführten DNA-Polymerasen gibt es nur drei kurze konservierte Aminosäureblöcke (I, II und III), deren Reihenfolge und ungefährer Abstand stets der gleiche ist (Bernard et al. 1987, Wong et al. 1988). Beim Herpes-simplex-Virus durchgeführte Kartierungen von Mutationen, die die Nukleotid-Bindestelle betreffen, fallen alle in die Nähe der drei konservierten Domänen I, II und III (Gibbs et al. 1985, Knopf 1986, Tsumuri et al. 1987). Die Kartierung von Mutationen der T4-DNA-Polymerase weisen darauf hin, daß sowohl zentrale Teile als auch das Carboxy-terminale Drittel dieser Polymerase an der Nukleotid-Bindestelle beteiligt sind (Spicer et al. 1988, Reha-Krantz 1988). Dort liegen auch die drei Domänen. Folglich könnten die drei Domänen Teile der Nukleotid-Bindestelle, eines wichtigen Bestandteiles von DNA-Polymerasen, darstellen. Damit stellen die Domänen vermutlich trotz ihrer Kürze ein eindeutiges Identifikationsmerkmal für zumindest eine Gruppe von verwandten DNA-Polymerasen dar.

Andere Mutationen des T4-Enzyms betreffen die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Sie liegen alle in der Amino-terminalen Hälfte des Proteins (Spicer et al. 1988, Reha-Krantz 1988). Dort gibt es unter den DNA-Polymerasen eine schwach konservierte Region, die allerdings bei den DNA-Polymerasen der anderen Bakteriophagen (PRD1, Phi29) nicht auftritt. Bei den Plasmid-codierten DNA-Polymerasen ist sie nicht eindeutig nachzuweisen. Zum Überprüfen einer Korrelation dieser Region mit einer Exonuklease-

Aktivität, wäre es interessant zu wissen, welche der miteinander Homologie zeigenden DNA-Polymerasen überhaupt eine Exonuklease-Aktivität besitzen. Zu einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase α , die vermutlich das Kerngenom der Eukaryonten repliziert, existieren widersprüchliche Befunde (Kunkel et al. 1988). Außerdem besitzt die DNA-Polymerase des *Bacillus*-Phagen Phi29 die Exonuklease-Aktivität (Blanco und Salas 1985), obgleich dort die konservierte Region nicht gefunden wurde.

URF1 von pClK1 besitzt nicht nur alle Domänen, sondern sie treten auch in ähnlicher Anordnung wie in den aufgeführten DNA-Polymerasen auf (Abb.9). So könnte auch URF1 für eine DNA-Polymerase codieren.

Unter den aufgelisteten DNA-Polymerasen gibt es etliche, von denen nachgewiesen ist, daß sie mit einem Protein-Primer arbeiten (Adenovirus, Bakteriophagen Phi29 und PRD1). Von den DNA-Polymerasen der linearen Plasmide S1 (*Z. mays*), pGK11 (*K. lactis*), pGK12 (*K. lactis*) und pClK1 (*C. purpurea*) kann man ebenfalls erwarten, daß sie anstelle eines RNA-Primers mit einem Protein-Primer arbeiten, da der sehr ähnliche Aufbau aller dieser Moleküle einen ebenso ähnlichen Replikationsmodus vermuten läßt. Wie in Abb.9 angedeutet, scheint es hinter der Domäne I einen kleinen Bereich zu geben, der für mit RNA- bzw. Protein-Primern arbeitenden DNA-Polymerasen verschieden ist.

Von der DNA-Polymerase α (Mensch) und I (*S. cerevisiae*) wird berichtet, daß sie ein Aminosäure-Motiv besitzen, daß als "Zink-Finger" bezeichnet wird (Wong et al. 1988, Pizzagalli et al. 1988). "Zink-Finger" sind eine vermutete gemeinsame Struktur verschiedenster Nukleinsäure bindender Proteine, die als Zink-Chelat existiert (Evans und Hollenberg 1988). Das mögliche URF1-Produkt von pClK1 besitzt dieses Aminosäure-Motiv nicht. Es tritt im übrigen auch in den meisten anderen beschriebenen DNA-Polymerasen, die Homologie zu dem URF1-Produkt von pClK1 zeigen, so nicht auf. Für eine endgültige Beurteilung wäre es nicht uninteressant zu wissen, welche der DNA-Polymerasen für ihre Funktion Zink benötigen.

Um den Grad der Homologie zwischen den einzelnen DNA-Polymerasen abschätzen zu können, wurden alle paarweise einem Vergleich unterzogen. Die Bedingungen des Vergleiches sind so ausgelegt, daß einerseits kurze, stark homologe Bereiche (≥ 12 Aminosäuren mit einer Homologie $\geq 65\%$) und andererseits längere, schwächer homologe Bereiche (≥ 40 Aminosäuren mit 40% Homologie, ≥ 100 Aminosäuren mit 32% Homologie) erfaßt werden. Tab.4 zeigt das Ergebnis des Vergleiches. In der Tabelle ist die Rangfolge der jeweiligen Homologie für jede einzelne DNA-Polymerase aufgeführt, wobei einige DNA-Polymerasen stellvertretend für eine ganze Gruppe stehen. Die Darstellungsform von Tab.4 wurde gewählt, da eine andere Darstellung des Homologievergleiches zu unübersichtlich wäre.

In Anhang B findet sich eine Auflistung der Homologien, bei der sowohl Länge als auch die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren angegeben wurde. Bei der vergleichenden Bewertung der Homologien wurden Domänen enthaltende Bereiche stärker gewichtet, da sie vermutlich in einer für die Funktion der Polymerase wichtigen Region liegen. Zudem wurden

längere Homologiebereiche als ein Anzeichen höherer Homologie gewertet als kürzere, da sie weniger zufallsbedingt sein sollten.

	I	II	III
* pClk1	DVNSLYPFSIN DIFGLK	KLILN SLIGRFG	YTDTSIVT
* S1	DVNSLYPSSMLD DIFICK	KIIMN SLYGRFG	YTDTSVVV
* pGK11	DVKSLYPASMAFYDQYGS	KIIMN SLWGKFA	YSDTDSISV
* pGK12	DVNSLYPSAMKLLKHSYCK	KIALNGGGYCKFV	YSDTDSIFV
* PHI29	DVNSLYPAQYSRLLPYGE	KLMLN SLYGKFA	YCDTDSIHL
* PRD1	DVNSMYPHAMRNFRHFFSD	KLILN SSYGKFA	YCDTDSIIC
T4	DLTSLYPSIIHQVNLSPET	KILIN SLYGALG	AGDTDSVVV
* Ad2	DICGMVASALTH PMEWGP	KLLSN ALYGSAFA	YGDTSDFV
HSV	DFASLYPSIIQAHLNCFST	KVVCN SVYGTG	YGDTSIFV
Vaccinia	DVNSLYPNVCIFGNLSPET	KIVAN SVYGLMG	YGDTSVFT
Pola	DFNSLYPSIIQEFNICFTT	KLTAN SMYGCLG	YGDTSIMI

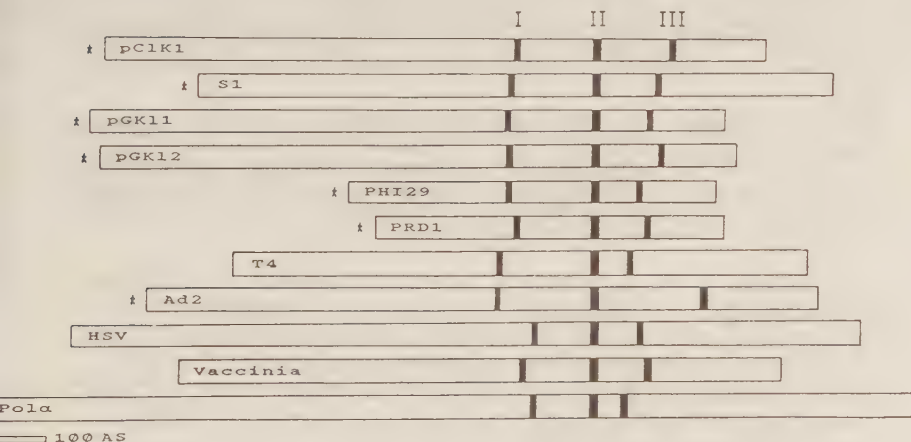


Abb.9

Vergleich des möglichen URF1-Produktes von pClk1 mit DNA-Polymerasen. DNA-Polymerasen, die vermutlich mit einem Protein-Primer arbeiten, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Herkunft der verschiedenen Polymerasen ist folgende: pClk1 (mtPlasmid; *C. purpurea*), S1 (mtPlasmid; *Z. mays*), pGK11 und pGK12 (Plasmid; *K. lactis*), PHI29 (*Bacillus*-Phage), PRD1 (Phage verschiedener Gram-negativer Bakterien), T4 (*E. coli*-Phage), Ad2 (Adenovirus Typ2), HSV (Herpes-simplex-Virus), Vaccinia (Pockenvirus), Pola (Mensch, Zellkern) (Referenzen s. Liste der DNA-Polymerasen auf S.23).

Oben: Gemeinsame Domänen I, II und III, deren konservierte Aminosäuren umrahmt sind. Hinter der Domäne I liegt eine Region, die für mit Stern () bzw. ohne Stern () gekennzeichnete DNA-Polymerasen unterschiedlich ist.

Unten: Räumliche Anordnung der Domänen. URF1 von pClk1 wurde vom ersten ATG-Codon an translatiert.

	pClK1	S1	pGK11	pGK12	PHI29	PRD1	T4	Ad2	HSV	Vaccinia	Pola
pClK1	*	1	4		3	2		5			
S1	1	*	2	4	5	3	8	9		7	6
pGK11	7	2/3	*	1	2/3	4			5		6
pGK12		2	1	*	3/4				5		3/4
PHI29	3/4	3/4	2	5	*	1		8	7	6	
PRD1	3/4	2	3/4		1	*		5			
T4		4					*		3	2	1
Ad2	6	7			3/4	1		*	2	3/4	5
HSV			3	7	5		6	4	*	2	1
Vaccinia		5			4		3	6	2	*	1
Pola		5	4	6			3	7	1	2	*

Tab.4

Paarweiser Vergleich von DNA-Polymerasen, die Homologie zum URF1-Produkt des Plasmides pClK1 zeigen:

Die Herkunft der DNA-Polymerasen ist entsprechend der Legende von Abb.9 abgekürzt (Referenzen s. Liste der DNA-Polymerasen auf S.23). Es wird jeweils die Rangfolge der Homologie der DNA-Polymerasen angegeben (1,2,3,4,...). Jeweils die vier stärksten Homologien sind gekennzeichnet.

Die Homologien befinden sich fast immer im Domänen beherbergenden Carboxy-terminalen Teil. Ohne einer Diskussion der Verwandtschafts-Verhältnisse der verschiedenen DNA-Polymerasen in Bezug auf lineare Elemente vorwegzugreifen, sei daraufhin gewiesen, daß eine gewisse Gruppenbildung zu beobachten ist. Eine Gruppe wird von den Plasmid-codierten und den Bakteriophagen-codierten DNA-Polymerasen gebildet. Eine zweite umfaßt die DNA-Polymerasen der Herpesviren, Pockenviren und der Eukaryonten.

3.4.3.2 URF2

Die Suche nach Homologien zu einem möglichen URF2-Produkt in der Proteindatenbank ergab eine Homologie zu der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Insgesamt zeigte sich, daß folgende RNA-Polymerasen miteinander Homologie zeigen:

- RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7 (McGraw et al. 1985, Moffat et al. 1984)
- RNA-Polymerase des Bakteriophagen SP6 (Kotani et al. 1987)
- mtRNA-Polymerase (*S. cerevisiae*) (Masters et al. 1987)
- URF1-Produkt des Plasmides S2 (*Z. mays*) (Kuzmin et al. 1988, Oeser 1988).

I

II

III

IV

(1) GKLIIVDKYI	LIE ILIES	PLKLFMIVAPKPYKKEEHGGY	IMESINMMATAFOINKKLLKY
(2) YNRITIAEDR	LASRKLEIV	EVSDFVITNLPLSSYR GGY	VLSAVKKLQROPVRINKIVYDF
(3) GKATIEEFR	LIS MLIQV	POLLPMIVIEPKPVVNWRSGGY	VYDGLAVLGRTFMTVMEKVFQV
(4) GKATIEEAR	LIE MLIES	PMFQFCVVPKPVVAITGGGY	VYKAMNLAQNTAMKINKKVLAV
(5) AERLEDOVR	LLE ILEGS	PAYAPCYIIEPRMTRTPFNGGF	VYKAINALQNTQHQINKKVLAV

V

VFPLKLDHGRGLYPITAYEHVSSBDAKALLLFAIPDTIERS	DSISIDVILKAYCATCFENKLDKKSVDKR
YFPFILDFGRMYRHGP FHFHERDILVRSLIIFD	ESDDSAHTINSVDGDRILHFLISAAYHKS
YFPHNLDFGRAYPLSPFHNLGNDMSRCLLIEWHCKK LG	PSGLKWLKIHLNLGFG DKLLPKDR
VFPPYNDWRGRVYAVPM ENPQGNDMITGGLITLAKGKP IG	KEGYVWLKIHGANCAGV DKVPFPER
YEVYAMDSRGRVYVQSSTLSPOSNDLGKALLRETEGRPVNG	VEALKMFICINGANLGGW DKKTDFVR

VI

VII

VIII

AENKMFFLAYCLE	LPQLQDGTICNGFQHIIVLLSNEVKLYSQLNDGKSKNQPS	GLSRANIKQAINTKPTN
QSKPTFFEKDITV	TPVFQDASASAYQIMSYPILLDIDYGIHTNLLKKTNTDGRV	IFDRMVMKKMEPMMYG
ADKPWQALATCFE	QPVHODGTICNGLOHYAALGCDVEGATQVNLVPSDKPQDVY	KITRKVMQOTVMTNVYV
QDSFFCFLAFCFE	LPFAFDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIY	GVTRSYIKRSVMTLAYG
ADAPVEFLAMCFE	LPVHFDGSCSGIQHYSAMLRDEVGAKAVNLKPSDAPQDIY	GITRSLTKKPVMTLPYG

IX

X

XI

ITSLPTLEVHOQY	DKVKQOIALMPNLIHSLDAASL	GVVNEYSVHDCYGV
VVYSTPVPVVTLL QTY	DIRKSSSTTFANFIHQDAFTA	SSIPTYAVHDMETI
VIMTTPPLPLPIVOPY	NARROKAGLPNFIHSLDASHM	QGLDFASVHDSVWT
VHMTTPDGFPVVOQY	DAHKQESGIAPNFVHSODGSHL	GIESFALIHDSFGT
LMYITLPTGFILEOKI	DEAAMMGAAAPNFVHGHDSHL	GVTSTAVIHDSFGT

I II III IV V VI VII VIII IX X XI

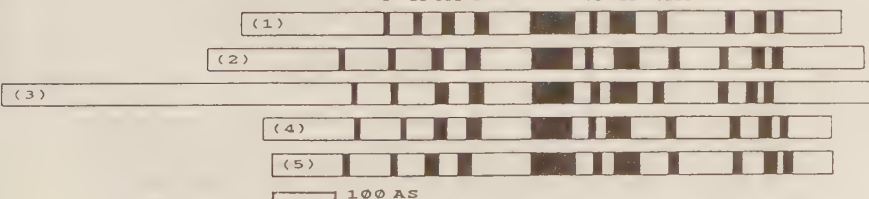


Abb.10

Vergleich des möglichen URF2-Produktes des Plasmides pCIK1 (1) mit dem URF1-Produkt des S2-Plasmides (*Z. mays*) (2), der mitochondrialen RNA-Polymerase von *S. cerevisiae* (3) und den RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 (4) und SP6 (5) (Referenzen s. Liste der RNA-Polymerasen auf S.26).

Oben: Gemeinsamen Aminosäureblöcke, deren konservierte Aminosäuren umrahmt sind. Nur zwischen (1) und (2) konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt.

Unten: Räumliche Anordnung der Domänen. URF2 von pCIK1 wurde vom ersten ATG-Codon an translatiert.

Da die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7 über das gesamte Protein hinweg eine hohe Homologie besitzen, wird die T3-RNA-Polymerase für beide Polymerasen stellvertretend in allen folgenden Vergleichen behandelt. Von Masters et al. (1987) wurden zwischen der RNA-Polymerase der T-Phagen und der nukleär codierten mtRNA-Polymerase von S. cerevisiae acht Homologieblöcke in vergleichbarem Abstand zueinander gefunden.

Zumindest in S. cerevisiae ist die mitochondriale RNA-Polymerase kern-codiert. Das Gen liegt auf Chromosom VI. Seine Zerstörung (durch "gene disruption") führt zu Petittwuchs – ein klarer Beweis für eine wichtige Rolle in Mitochondrien (Greenleaf et al. 1986). In Chloroplasten dagegen scheint die RNA-Polymerase vom Organell-Genom selber codiert zu werden. Dafür sprechen Sequenzdaten vom Spinat, Tabak und dem Lebermoos *Marchantia* (Ummesono und Ozaki 1987, Hudson et al. 1988).

Unter Einbeziehung aller aufgeführten RNA-Polymerasen kann man elf konservierte Aminosäureblöcke finden. Das eventuell vom URF2 des Claviceps-Plasmides pClK1 codierte Protein besitzt alle konservierten Blöcke in derselben Reihenfolge und ähnlichem Abstand zueinander (s. Abb.10). Dabei zeigt sich, daß sich die Homologie des URF1-Produktes des Plasmides S2 (Z. mays) im Block V nur durch die Homologie zum möglichen URF2-Produkt von pClK1 (C. purpurea) in der gesamten bei Masters et al. (1987) definierten Ausdehnung finden läßt (s. Markierungen in Abb.10).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1)	*	25,4	35,7	37,7	33,3
(2)	25,9	*	29,6	27,5	25,5
(3)	36,4	29,6	*	44,5	40,5
(4)	38,5	27,5	44,5	*	55,5
(5)	33,8	25,4	40,3	55,2	*

Tab.5

Paarweiser Vergleich von RNA-Polymerasen, die Homologie zum URF2-Produkt des Plasmides pClK1 besitzen:

Die Herkunft der RNA-Polymerasen ist entsprechend der Legende von Abb.10 abgekürzt (Referenzen s. Liste der RNA-Polymerasen auf S.26). Angegeben ist jeweils der Homologiegrad in Prozent innerhalb aller elf konservierten Aminosäureblöcke (s. Abb.10). Jeweils die beiden stärksten Homologien sind markiert.

Da der durch die konservierten Aminosäureblöcke vorhandene Homologiebereich zwischen allen RNA-Polymerasen recht groß ist, wurde er zur Abschätzung des Homologiegrades herangezogen. Tab.5 gibt die Gemeinsamkeiten zweier RNA-Polymerasen in Prozent und bezogen auf alle elf konservierten Blöcke an.

3.4.3.3 URF3, URF4, URF5 und URF6

Ein Vergleich der vier kleinen URFs, deren Länge zwischen 100 und 120 Aminosäuren liegt, mit den Proteinen der Datenbank ergab keine signifikante Homologie.

Die Proteindatenbank enthält keines der URF-Produkte der sequenzierten linearen Plasmide S1, S2 (*Z. mays*) und pGK11, pGK12 (*K. lactis*). Da die beiden großen URFs von pClK1 Homologie zu Protein-codierenden Regionen der Plasmide S1, S2, pGK11 bzw. pGK12 zeigten, erschien es sinnvoll, diese Plasmide auf kleinere URFs hin zu untersuchen. Es wäre möglich, daß lineare Plasmide eine ähnliche Grundausstattung tragen. Alle vier Plasmide enthielten den kleinen URFs von pClK1 vergleichbare URFs. Ein Vergleich miteinander ergab, daß zwischen ihnen keine signifikanten Homologien bestehen.

Alle darauf hin untersuchten linearen Plasmide, so auch pClK1 (Düvell et al. 1988), tragen terminale Proteine an ihren Enden. Ähnlich strukturierte lineare Viren codieren soweit bekannt stets selber für ihr terminales Protein, so daß man vermuten kann, daß pClK1 eine das terminale Protein-codierende Region enthält. Es wäre möglich, daß einer der kleinen URFs mit dieser Region identisch ist.

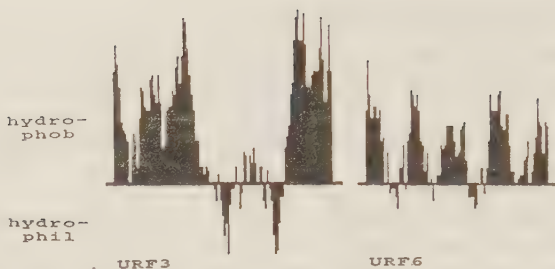
Die einzige Gemeinsamkeit zwischen allen bekannten viralen terminalen Proteinen ist offenbar eine Aminosäure im Carboxy-terminalen Bereich, die die kovalente Bindung mit einem Nukleotid eingeht, so daß das terminale Protein als Primer während der Replikation dienen kann. Wahrscheinlich ist entweder die Aminosäure Serin (Adenovirus, Bakteriophagen Phi29, Nf und PZA), Threonin (Bakteriophage Cp-1) oder Tyrosin (Bakteriophage PRD1) über eine Phosphodiesterbindung mit einem Nukleotid verbunden (Hermoso et al. 1985, Garcia et al. 1986, Leavitt und Ito 1987, Hsieh et al. 1987). Nach Computeranalysen befindet sich die betreffende Aminosäure in einem hydrophilen Bereich, der dort die Sekundärstruktur eines "β-turns" besitzt. Dem "β-turn" geht eine α-Helix voraus (Hermoso et al. 1985, Leavitt und Ito 1987).

Obwohl sowohl Serin als auch Tyrosin und Threonin eine Hydroxyl-Gruppe besitzen, die als Donor für die Phosphodiesterbindung zum Nukleotid dienen kann, scheinen sie miteinander nicht austauschbar zu sein. Eine Mutation, die zu einem Austausch des bindenden Serins des terminalen Proteins vom Phagen Phi29 mit einem Threonin führte, brachte ein terminales Protein hervor, das zwar noch mit der DNA-Polymerase interagiert, aber in der Bildung des Replikations-Initiations-Komplexes inaktiv war (Garmendia et al. 1988).

Sowohl das Hydropathieprofil als auch die von der Aminosäuresequenz abgeleitete Sekundärstruktur der möglichen Produkte der vier kleinen pClK1-URFs wurden untersucht. Es konnte kein Serin, Threonin oder Tyrosin gefunden werden, das sowohl in einem hydrophilen Bereich als auch in einem "β-turn" lag. Dabei stellte es sich heraus, daß das vermutliche Produkt des URF3 und des URF6 fast völlig hydrophob ist (s. Abb.11).

Abb.11

Hydropathieprofil der
Produkte von URF3
(120 AS) und URF6
(100 AS) des Plas-
mides pClK1



4. Homologie von pClK1 zur hmw mtDNA des Stammes W3

4.1 Eingrenzung und Charakterisierung der Homologie von pClK1 zur hmw mtDNA des Stammes W3

Die Claviceps-Plasmide zeichnen sich durch Homologie zur eigenen mtDNA und/oder zur mtDNA anderer Claviceps-Stämme aus. Das Plasmid pClK1 zeigt unter stringen-ten Bedingungen keine Homologie zur mtDNA des eigenen Stammes, jedoch besitzt es Homologie zur mtDNA der Stämme T5, T6, T9a, 13/46, Bay4, W7 und W3 (Tudzynski et al. 1986, Tudzynski und Esser 1986, Tudzynski pers. Mitteilung). Die Beziehung von pClK1 zur W3-mtDNA wurde näher untersucht.

Die Homologie der hmw mtDNA des Stammes W3 zum Plasmid pClK1 (Stamm K) war bereits auf ein 2,8 kb großes EcoRI/SalI-Fragment eingegrenzt. Dieses Fragment der mtDNA aus dem Stamm W3 zeigt gleichzeitig Homologie zum lrRNA-Gen ("large ribo-somal" RNA-Gen) (Tudzynski und Esser 1986).

Der Vektor pWES/1 enthielt das 2,8 kb-Fragment als Teil eines 4,6 kb-Fragmentes. Um für weitere Untersuchungen allein den homologen Bereich zur Verfügung zu haben, wurde das 4,6 kb-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und SalI subkloniert. Das Hybridplasmid pWES3 enthält nur noch das zu pClK1 homologe, 2,8 kb große EcoRI/SalI-Fragment der W3 mtDNA.

Das Hybridplasmid pWES3 wurde unter stringenten Bedingungen gegen das restrin-gierte Plasmid pClK1 hybridisiert. Abb.12 zeigt die bei Restriktionen von pClK1 mit EcoRI, HaeIII, HpaI und XbaI hybridisierenden Fragmente. Es wird deutlich, daß die Homologie auf terminale Bereiche des Plasmides beschränkt ist (Tudzynski et al. 1986).

Um die Homologie auch in der umgekehrten Richtung einzugrenzen, wurde eine Re-striktionskarte des mitochondrialen Insertes von pWES3 erstellt, die einige wenig schneidende Restriktionsendonukleasen erfaßte. Hybridisierungen des Plasmides

pClK1 gegen das isolierte, restringierte 2,8 kb-Fragment ermöglichten eine Einengung der Homologie auf ein 0,86 kb großes CfoI/HaeIII-Fragment (s. Abb.13) (Tudzynski et al. 1986).

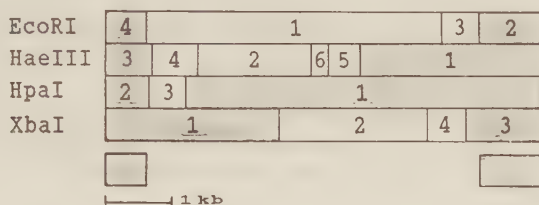


Abb.12

Restriktionskarte des Plasmides pClK1 (Stamm K). Fragmente, die Homologie zu dem 2,8 kb großen EcoRI/SalI-Fragment der hmw mtDNA vom Stamm W3 zeigen, sind gekennzeichnet. Die Grenzen der Homologie von pClK1 zur hmw mtDNA von W3 sind markiert.

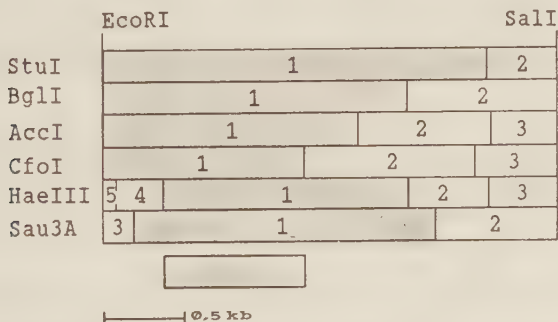


Abb.13

Restriktionskarte des 2,8 kb großen EcoRI/SalI-Fragmentes der hmw mtDNA vom Stamm W3. Fragmente, die Homologie zum Plasmid pClK1 (Stamm K) zeigen, sind gekennzeichnet. Die Grenzen der Homologie der hmw mtDNA von W3 zu pClK1 sind markiert.

Die zwei kleinsten Fragmente des 2,8 kb mtDNA-Insertes im Hybridplasmid pWES3 sind zu klein (EcoRI/HaeIII-Fragment von 68 bp, EcoRI/Sau3A-Fragment von 168 bp), um ihre Homologie mit einer Southernhybridisierung von übertragenen Agarose-Gelen nachweisen zu können. Folglich war unklar, ob der Bereich direkt rechts neben dem EcoRI-Schnitt (s. Abb.13) mit pClK1 hybridisierte. Um eine Hybridisierung auszuschließen, wurde ausgenutzt, daß das dem 68 bp großen EcoRI/HaeIII-Fragmentes benachbarte HaeIII-Fragment nicht hybridisierte. Nach einer partiellen Restriktion mit HaeIII sind beide Fragmente verbunden, auf Nitrozellulosefilter übertragbar und ergeben nach Hybridisierung mit ³²P-markiertem pClK1 kein Signal.

Das "α" im Namen bezieht sich darauf, daß das zu pCIK1 homologe 2,8 kb EcoRI/Sall-Fragment der hmw mtDNA von W3 ursprünglich als α-Fragment bezeichnet wurde (Tudzynski und Esser 1986).

mtDNA-Fragment

100 bp

Restriction sites (from left to right):

- PciKI
- EcoRI
- DdeI
- TaqI
- DdeI
- ScaI/RsaI
- HindII
- DdeI
- AluI
- TaqI
- Sau3A
- Sau96I
- TaqI
- HinfI
- DdeI
- AluI
- AluI
- Sau96I
- RsaI
- AluI
- NruI
- TaqI

Vergleich der Feinrestriktionskarten des rechten Endes von pCIK1 (Stamm K) und des zu pCIK1 homologen CfoI HaeIII-Fragmentes der hmw mtDNA vom Stamm W3.

4.2 Sequenzierung der zu pCIK1 homologen Region der hmw mtDNA (Stamm W3)

32

TAGGAGAAAAGCAAAAGATAAAAAAAAGGTGAAGCAAGCGCTTTCTTTGTTGAGCTAAAGTAAGACCTGCGGGTTTTAGCGGAAAGCTTAACCGAAAGCCTGTGCCAGTTTCTGCTTTTC 960
ATCTCTCTTTGCTTTCTATTTTTTTCGATTCACGTGTGTCGGAGAAAGAAACATCGATTCTATTGTCGACGCCAAATTCGCTTTTCAAAATGGGTTGTGGACACGGTAAACAAAGAG
TATTAATTTAGTTCAGGACAGGGTTAGAAACGTTGTATTTGACTAATAAGAAATTAACATAGTAAATTTCAATTGGACCTGAAATGAGGAATTTGGGTTTAGCGAAAGAACTATTAAATAGT 1000
ATTATTTAATCAATCGGTTCCCAATCTTTGCAACATACGATCATTTTCTTAATTGTATCATTTTTAAGTTAGCCTGGAGTTTAGCGGTTTAAACATTAATTGGTTTCTTGATAATTATCA
CfoI
ACAGCAAAAGCTAGTACTTCAACAGAACCAAGTCAATAATTAATCAGAAAGCATTTAACGGTAAACACCGTGAGAGACCTCATGGGTAGCAAAATCTCTCTCTTATAAGACGGGACGAGAAA 1040
TGTGTTTTCATCATAGATTGTGTGGTTCAGTTATTAAATAGTCTTCGTGAATTTGCCATTTTGGGACCTCTCTGGAGTACCGATCGTTTAAGAGAGAGATATTGCTGCTCTCTTTT
AGGAGAGAGAAAAGATACGCTCTCTCTCTCTGTGTGGACCGCGCCATCGGTCAGGGCAGAGAGATAGCTTAATACAAATTTAATATGGCTAGCGACCTTTAATAAGGGCTGCTTC 1080
TCTCTCTCTTTTTCATGAGGAGAGAGAGGACACACACATCTGGGCGGTAGCCAGCTCGGTTCTCTCATCAATTGTGTTTATATATTAATACCGATCGTGGAAATTTTCCGACAGAGAG
TATTTTATATAATAAAATTAACAAAGCGCTCTCTCTCTATTTTTATTAATAATCTGGTATGGGATTTGGTAACATGTAGATTCTTAAATTTGCATATCTGGCTAGAGAGGTTTATAGAGGAT 1440
ATAAAATATATTATTTTATTGTCTCCGAGGAGAGATAAATCAAAATATTTTACAGCATCCCGCTAACCATTTGTATCATCTTAGANTTTATAGTATAGGGGAATTTCCGAATATTTCTTA
AccI
TATATTCTAAATCAATAAAAAAAGAAATGTATGTCTAAGATATATATGTCTAACTATATTAAGTGAATCTAGAGCAAGCACTATATGGAATTAAGCTATGAATTTAAAGAGA 1560
ATAATAGATTTTAGTTATTTTTTTTTTCTAACATTCGAATTCATATATTACGATTTAGATTAATTTTACTTTGATATTTCTTTGGATATACCTTAATTTTCGATCTTGAAATTTCTCT
AGAATTTCAACATATAGGTTTAACTCAAGAGAAATCGATTAAGAAACGAAGTGAACTAGAAATTCAGATACGTTTAGGAGAAAGAAATCTCAGGAGATTCTATGGGTAGCGAGAGCGAG 1600
TCTTAAATGGTTATATCAATTTGAGTTTCTCTTTAGCTCATTTTTTGCTTCACTTGACTTTATAGTTTCAATGAAATCTCTTTCTTTAGAGTCTCTCAAGATACCATCGGCTGCGGCTC
AGTAGAGAGGCGAGAAAGTAAACCGGAATTAAGAGATTTTGTTTTAAAGAGGTTGAACCATTCATCGAAGCCTAAATATAATTCATAGCGGATAGAGCAAGAGTACCGAGAGGGAATTAAGA 1800
TCATCTCTTCGCTCTTCATTTTTGGCTTATTCCTTAACAAAAATTTTCTCCACTTGGTAGTAGCTTGGATTTATATTAAGTATTGGTATCTGCTCTCATGGCTCTCCCTTTTAATTTCT
TAAATAGTAGTTTTATAAGCAGTCCGGCG
ATTTCATCAAAATATTCTGCAGCGCGC

Die GC-reiche Sekundärstruktur der 39 bp-Region ist wahrscheinlich diejenige, die zunächst die Sequenzierung dieser Region behinderte (Kap. 4.2).

[illegible]

Abb. 17

Sequenzvergleich des rechten Endes von pOLK1 (Stamm K) mit dem zu ihm homologen Bereich der mtDNA des Stammes W3. Gleiche Nukleotide sind durch Sternchen gekennzeichnet. Die Aminosäuresequenz von URF5 (pOLK1 - Stamm K) und URF4 (hmw mtDNA - Stamm W3) ist ober- bzw. unterhalb des Nukleotidvergleiches aufgeführt. Nicht identische Aminosäuren beider URFs sind umrandet.

Im homologen Bereich besteht eine Übereinstimmung von durchschnittlich 94,8%, wenn man von den beiden in die hmw mtDNA von W3 "eingeschobenen" Regionen absieht. Die rechte Grenze der Homologie zwischen pClK1 und der W3 mtDNA ist eindeutig, da sie durch das Plasmid-Ende bestimmt wird. Dort kann man die 10 bp-Homologie des TIR von pClK1 zum "Replikationsursprung" der Adenoviren in der W3

mtDNA nicht wieder finden (s. zum Vergleich Abb.7). Die linke Grenze liegt wahrscheinlich bei Position 408 (W3 mtDNA-Fragment) bzw. Position 6027 (pCIK1) (s. Abb.17), da vor diesem Bereich nur noch geringe Homologie besteht. An den Grenzen findet sich keine Duplikation von wenigen Basen der hmw mtDNA-Sequenz von W3.

[illegible]

Sequenzvergleich der sequenzierten Region der hmw mtDNA (Stamm W3, *C. purpurea*) zur hmw mtDNA-Sequenz von *A. nidulans*. Gleiche Nukleotide sind durch Sternchen gekennzeichnet. "A" kennzeichnet das von Netzker et al. (1982) und "B" das von Dyson et al. (1988) bestimmte 5'-Ende des IrRNA-Genes von *A. nidulans*.

noch die Aminosäure-Homologien, doch ist der entsprechende Abschnitt der W3 hmw mtDNA durch Stopp-Codone unterbrochen.

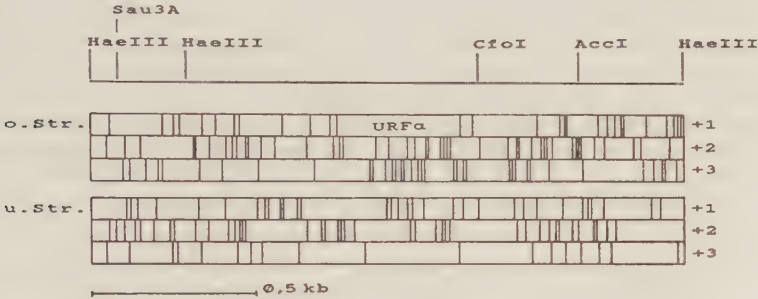


Abb.19

Lage der Stopp-Codone in den möglichen Leserastern (+1,+2,+3) des oberen (o.Str.) und des unteren (u.Str.) Stranges der sequenzierten Region der hmw mtDNA von W3. Die Lage einer möglichen Protein-codierenden Region ist markiert (URFa).

5. Diskussion

C. purpurea gehört zu der überwiegenden Mehrheit von Eukaryonten, die Mitochondrien besitzen. Nur einige Protozoen und Pilze leben ohne Mitochondrien (Cavalier-Smith 1987, Deacon 1984). Die mitochondriale DNA von C. purpurea ist 45-50 kb groß und zirkulär. Sie trägt vermutlich die gleiche Genausstattung wie die mtDNA anderer filamentöser Pilze (Brown 1987). Auf der mtDNA findet man Gene, die für Elemente der mitochondrialen Proteinsynthese codieren und Gene, die für Proteine der Elektronentransportkette und der ATP-Synthese codieren. Die Gene für die kleine und große ribosomale RNA sowie die Gene für Cytochrom b, für die Untereinheiten I und II der Cytochrom c-Oxidase und für die ATPase Untereinheit 6 wurden durch heterologe Hybridisierung auf der C. purpurea mtDNA nachgewiesen und lokalisiert (Tudzynski und Esser 1986).

Umfassende Informationen zur Struktur, zum Informationsgehalt und zur Evolution der mitochondrialen DNA findet man in den Reviews von Gray (1982), Wallace (1982) sowie Ebringer und Krajcovic (1987).

Neben der hochmolekularen mtDNA tragen viele Claviceps-Stämme lineare mitochondriale Plasmide. Der am besten untersuchte Stamm ist der Stamm K, der die drei Plasmide pClK1, pClK2 und pClK3 trägt. Die Diskussion der Sequenzdaten des Plasmides pClK1 soll zur Aufklärung der Beziehung der drei Plasmide untereinander, der Funktion von pClK1 und seiner Herkunft beitragen. Darüberhinaus befaßt sich die Diskussion mit der Homologie zwischen dem Plasmid pClK1 (Stamm K) und der hmw mtDNA des Stammes W3 sowie deren Entstehung.

5.1 Entstehen von pClK2 und pClK3

Die zu pClK1 kolinearen Plasmide pClK2 und pClK3, die man in mitochondrialen DNA-Aufarbeitungen in geringerer Konzentration als das Plasmid pClK1 findet, sind augenscheinlich keine Präparationsartefakte - wie schon von Düvell et al. (1988) ausgeführt wird. Die Kolinearität legt nahe, daß pClK2 und pClK3 aus dem Plasmid pClK1 entstehen. Dies wird dadurch unterstrichen, daß die Kolinearität nicht nur in Bezug auf die Restriktionskarte der drei Elemente besteht, sondern sich eventuell auch auf die Struktur von pClK2 und pClK3 erstreckt. pClK2 und pClK3 tragen vermutlich nur an einem Ende ein terminales Protein (Düvell 1988). Ein Modell zum Entstehen von pClK2 und pClK3 aus pClK1 muß für folgende Punkte eine Erklärung bieten:

- 1) in vivo-Existenz von pClK2 und pClK3
 - 2) Koexistenz von pClK1 mit seinen Produkten pClK2 und pClK3 im Stamm K
 - 3) Nichtexistenz von kleineren Plasmiden im Stamm Bay4, dessen Plasmid pClB4 durch Restriktionsanalyse nicht vom Plasmid pClK1 unterschieden werden kann.
- Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß eine Endonuklease an der Entstehung der beiden kleinen Plasmide beteiligt sein könnte (Düvell et al. 1988).

Um die Hypothese zu prüfen, wurde nach Strukturbesonderheiten in dem Bereich von pClK1 gesucht, in dem pClK2 und pClK3 aufeinandertreffen. Es gibt dort vier kurze Sequenzen mit Palindromcharakter, die als Bindestelle für ein Protein dienen könnten (s. Tab.2). Interessanterweise liegen zwei der palindromartigen Sequenzen in einem Bereich, der theoretisch befähigt ist, eine Sekundärstruktur auszubilden (s. Abb.4). Die Existenz von Sekundärstrukturen ist nicht unumstritten. Man nimmt an, daß DNA in "Supercoil"-Form fähig ist, Sekundärstrukturen auszubilden. Von linearen DNA-Molekülen dagegen wird vermutet, daß das Molekül fast ständig vollständige Basenpaarung aufweist und daß sich nur die Paarung einzelner Basen vorübergehend öffnet (Lilley 1988). Das schließt nicht unbedingt aus, daß lineare Plasmide in der Zelle Sekundärstrukturen ausbilden können, da alle Erkenntnisse über lineare DNA-Moleküle an Oligonukleotiden oder Fragmenten in in vitro-Experimenten gewonnen wurden. Allerdings müßte man zur Ausbildung und Stabilisierung einer Sekundärstruktur eine Beteiligung von Proteinen oder anderen Faktoren fordern. Bei Ausbildung einer stabilisierten Sekundärstruktur wäre die Erkennungsstelle für eine Endonuklease zumeist nicht verfügbar und nur ein Teil von pClK1 würde in die kleineren Plasmide pClK2 und pClK3 überführt. Zusätzlich entstehen durch Replikation pClK1-Moleküle. Dadurch würde sich ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen der drei Plasmide einpendeln.

Auch wäre es denkbar, daß die gefundene Sekundärstruktur keine Bedeutung für das Entstehen von pClK2 und pClK3 hat. Eine mitochondrial lokalisierte Endonuklease mit geringer Aktivität oder ein normales mitochondriales Protein, das in Bezug auf pClK1 eine Nebenaktivität entfaltet, die mit seiner Funktion nichts zu tun hat, wären eine andere Erklärungsmöglichkeit. In beiden Fällen fehlt entweder dem Stamm Bay4 das Protein - eventuell eine Endonuklease - oder seinem Plasmid pClB4 die Bindestelle für das Protein (Düvell et al. 1988).

Zum Prüfen der Situation im Stamm K könnten folgende Experimente durchgeführt werden: 1) Bestimmen zumindest eines Teiles der Sequenz von pClK2 und pClK3, um ihre Identität zu dem jeweils kolinearen Teil von pClK1 zu testen, 2) Bestimmen der exakten Enden der Plasmide pClK2 und pClK3 durch Sequenzieren (nativ oder nach Klonierung) und Lokalisation der Plasmid-Enden auf pClK1, um nachzusehen, ob sie mit den oben angesprochenen Strukturbesonderheiten korrelierbar sind, 3) Untersuchen der pClK2/3-Übergangsregion entsprechenden Region des Plasmides Bay4, 4) *in vitro*-Versuche durch Zugabe von mitochondrialen Proteinpräparationen des Stammes K bzw. Bay4 zu pClK1 bzw. pClB4, das Entstehen von kleineren Plasmiden herbeizuführen.

In diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung bei der Southern-Analyse von Plasmid-Präparationen des Stammes K mit radioaktiv markiertem Plasmid pClK1 interessant. Man beobachtet zusätzlich zu den Banden von pClK1, pClK2 und pClK3 eine Anzahl von schwachen Banden (Tudzynski pers. Mitteil.). Die Banden, die größer als pClK1 sind, stellen wahrscheinlich Replikationsintermediate von pClK1 dar. Das Auftreten von kleineren Banden spricht dafür, daß pClK2 und pClK3 nicht die einzigen Produkte von pClK1 sind.

Insgesamt hat es den Anschein, daß pClK2 und pClK3 keine selbständigen Plasmide sind, sondern aus dem Plasmid pClK1 hervorgehen. Darum richtet sich in den folgenden Kapiteln die Aufmerksamkeit auf das Plasmid pClK1.

5.2 "terminal inverted repeat" (TIR)

TIRs sind ein Charakteristikum etlicher Transposone, einiger Viren und aller daraufhin untersuchten linearen Plasmide. Übereinstimmend mit Untersuchungen anderer Gruppen kann auch für den TIR von pClK1 keine ausgedehnte Sequenzhomologie zu TIRs anderer linearer Plasmide nachgewiesen werden. Vermutlich spielen entweder strukturelle Besonderheiten oder kurze Sequenzen, die vielleicht nur bei nahe verwandten Plasmiden gleich sind, für die Funktion des TIR eine größere Rolle.

Strukturelle Besonderheiten scheinen typisch für bestimmte TIRs zu sein (s. Kap. 3.3). Von ihnen findet man nur kurze Sequenzen (≥ 12 bp) mit nicht immer perfektem Palindromcharakter in allen veröffentlichten Sequenzen von TIRs linearer Plasmide (St. rochei: pSLA2, K. lactis: pGK11 und pGK12, S. kluyveri: pSKL, Z. mays: S1 und S2, Brassica: 2,3 kb Plasmid, C. purpurea: pClK1)(s. Tab.3). Sie kommen dort mindestens einmal vor. Das Palindrom in den TIRs von S1 und S2 (Z. mays) könnte an einer Rekombination zwischen S2 und der hmw mtDNA beteiligt sein (Scharl et al. 1985), doch nicht für alle der hier untersuchten Plasmide ist eine Beteiligung an Rekombinationen nachgewiesen. Palindrome werden auch als mögliche Bindestellen für Proteine diskutiert. Allerdings stimmt weder die Sequenz noch die Lage der gefundenen Palindrome überein. Folglich scheinen strukturelle Besonderheiten keine generelle Bedeutung für TIRs linearer Plasmide zu besitzen.

Eine Diskussion der TIR-Struktur bedeutet zugleich eine Diskussion des Replikationsmodus, da bei den ähnlich strukturierten Adenoviren und Bacillus-Phagen die TIRs mit den Replikationsursprüngen zusammenhängen (Gutierrez et al. 1988).

Sowohl bei Adenoviren als auch bei Bacillus-Phagen beginnt die Replikation an einem Ende des Moleküles und schreitet mittels eines Strangverdrängungsmechanismus voran (Tamanoi 1986). Falls die Replikation nicht an beiden Enden eines Moleküles gestartet wurde, bevor der neusynthetisierte Tochterstrang einen Elternstrang verdrängt hat, bleibt ein einzelsträngiges Molekül zurück. Lechner und Kelly (1977) postulierten für diesen Fall bei den Adenoviren eine "panhandle"-Struktur, die durch Basenpaarung zwischen den TIR-Sequenzen des einzelsträngigen Moleküls zustande kommt. Die Bereiche zueinander inverser Homologie, die man hinter dem TIR im Claviceps-Plasmid pClK1 findet (s. Abb.6), könnten eventuell zur Stabilisierung eines derartigen "panhandle"s beitragen.

Die im Vergleich zu den Adenoviren kurzen TIRs der Bacillus-Phagen (Adenoviren 50-160 bp, Bacillus-Phagen 6-8 bp) sind wohl nicht in der Lage, eine solche Struktur auszubilden.

Die Bildung des "panhandle" führt zu einem doppelsträngigem Ende, das den Enden des parentalen Moleküles entspricht. Dort gibt es bei der Adenoviren eine konservierte 10 bp-Sequenz, die zumindest bei den menschlichen Adenoviren unbedingt für die Initiation der Replikation erforderlich ist. Sie gilt als mögliche Bindestelle für den Replikations-Initiations-Komplex. Der Komplex besteht aus der vom Virus codierten DNA-Polymerase und einem mit einem Nukleotid kovalent verknüpftem terminalem Protein. Das proteingebundene Nukleotid dient an Stelle des sonst üblichen RNA-Primers als Anknüpfungspunkt für die Synthese des Tochterstranges (Campbell 1986).

Zusätzlich zu der konservierten 10 bp-Sequenz scheint es bei den menschlichen Adenoviren noch weitere Sequenzen im TIR, die für die Replikation wichtig sind, zu geben. Man kann zwei Bindestellen für nukleäre Faktoren finden, die allerdings vermutlich nicht von jedem Adenovirus benötigt werden (Pruijn et al. 1986, Harris und Hay 1988).

Interessanterweise besitzt der TIR von pCIK1 eine zu der 10 bp-Sequenz von Adenoviren homologe Sequenz (s. Abb.7). Damit gehört pCIK1 zu den Plasmiden, deren TIR Sequenzen tragen, die vermutlich mit der Initiation der Replikation bei bestimmten Viren zusammenhängen. Bei Bacillus-Phagen ist es offenbar der kurze konservierte TIR (6-8 bp) zusammen mit wenigen angrenzenden Basenpaaren, der Erkennungscharakter für die Initiation der Replikation zu besitzen scheint (Salas 1988, Gutierrez et al. 1988). Zu ihm besitzen die Enden des TIR einiger Plasmide aus pflanzlichen Mitochondrien Homologie (S1, S2, 2,3 kb Plasmid - Z.mays, 11,3 kb Plasmid - Brassica) (s. Kap.3.3).

Die Befunde der Analyse deuten daraufhin, daß eine Funktion des TIR von pCIK1 mit der Replikation zusammenhängt. Der Replikationsmodus von pCIK1 könnte dem von Adenoviren und Bacillus-Phagen gleichen. Weitere Funktionen des TIR liegen eventuell in der Initiation der Transkription - beide großen URFs von pCIK1 beginnen innerhalb des TIR (s. Abb.8) - und in der Rekombination der Claviceps-Plasmide, da die zu pCIK1 homologe Region der hmw mtDNA von W3 einen vollständigen TIR und ihm benachbarte Sequenzen beinhaltet (s. Abb.17).

5.3 Codierungskapazität

Da pCIK1 keinerlei Homologie zu RNA-Molekülen der Datenbank zeigt, scheint es weder für eine tRNA noch für eine rRNA zu codieren. Allerdings sind kleine RNA-Moleküle, die andere Funktionen - z.B. Enzymbestandteil mit katalytischer Funktion - haben, nicht in der Datenbank erfaßt, unabhängig davon ob sie pro- oder eukaryontischer Quelle sind.

pCIK1 besitzt sechs URFs (s. Abb.8) Die Funktion ihrer möglichen Produkte wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.3.1 Vergleich des möglichen URF1-Produktes von pClK1 zu DNA-Polymerasen

Auf Grund von Aminosäurehomologien ist es möglich, DNA-Polymerasen in zwei "Familien" einzuordnen. Familie A enthält die T7 DNA-Polymerase und die DNA-Polymerase I von E. coli (Ollis et al. 1985). Familie B dagegen umfaßt alle jene DNA-Polymerasen, deren Charakteristikum drei kurze Domänen sind (Jung et al. 1987b), die auch dem vermutlichen URF1-Produkt von pClK1 zu eigen sind (s. Abb.9).

Daneben gibt es zumindest noch eine DNA-Polymerase - die DNA-Polymerase β der Ratte - die sich nicht in dieses Schema einfügen läßt (Zmudzka et al. 1986).

Bis jetzt ist diese Einteilung eher eine "mathematische", da bislang die dreidimensionale Struktur keiner der DNA-Polymerasen aus der Familie B bekannt ist. Folglich ist es schwer abzuschätzen, ob und welche Strukturen oder Funktionsmechanismen von beiden Familien geteilt werden (Hall 1988).

Bernad et al. (1987) versuchten, die DNA-Polymerasen der Familie B noch weiter zu unterteilen: in solche, die von einem RNA-Primer abhängig sind und in solche, die mit einem Protein-Primer arbeiten. Von den in ihrer Arbeit angeführten Unterschieden, konnte nach dem hier vorgenommenen Vergleich (s. Abb.9) nur eine der Domäne I benachbarte Region ebenfalls gefunden werden. Ob dieser oder andere Unterschiede tatsächlich relevant sind, läßt sich erst mit Mutanten von DNA-Polymerasen zeigen, von denen bewiesen ist, daß sie mit einem Protein-Primer arbeiten. Da sowohl für Adenoviren als auch für den Bacillus-Phagen Phi29 in vitro-Replikationssysteme verfügbar sind, sollte es möglich sein, diese Arbeitshypothese zu prüfen. Die vorgeschlagene Unterteilung ist an sich sicherlich sinnvoll, da die DNA-Polymerasen des Adenovirus und des Phagen Phi29 mit dem terminalen Protein einen Replikations-Initiations-Komplex bilden (Campbell 1986, Salas 1988) und da DNA-Polymerasen, die mit RNA-Primern arbeiten, die Interaktion mit einem terminalen Protein fehlt.

Um herauszufinden, welche DNA-Polymerasen auf Grund der Aminosäurehomologie die größte Ähnlichkeit zu denen der linearen Plasmide haben, wurden alle miteinander verglichen (s. Tab.4).

Die replikative DNA-Polymerase der Mitochondrien - DNA-Polymerase γ - fehlt in diesem Vergleich, da ihre Primärstruktur nicht bekannt ist. So bleibt unklar, ob sie zu den DNA-Polymerasen der Familie B gehört. Eine Identität zwischen ihr und dem möglichen URF1-Produkt von pClK1 ist allerdings höchst unwahrscheinlich. Das URF1-Produkt scheint für C. purpurea nicht lebensnotwendig zu sein, da man den obligat aeroben Pilz vom Plasmid "heilen" kann (Düvell et al. 1988). Zudem wird angenommen, daß die DNA-Polymerase γ kerncodiert ist.

Die DNA-Polymerasen der Plasmide zeigen zueinander die größte Homologie. Die DNA-Polymerasen der mitochondrialen Plasmide S1 (Z. mays) und pClK1 (C. purpurea) stehen sich besonders nahe. In zweiter Linie steht ihre Homologie zu den

Bakteriophagen Phi29 und PRD1. Bei den Bakteriophagen Phi29 und PRD1 gilt Ähnliches: untereinander ist die Homologie der DNA-Polymerasen am größten, an zweiter Stelle kommen die möglicherweise Plasmid-codierten DNA-Polymerasen. Die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4, die nicht mit einem Protein-Primer arbeitet, zeigt engere Beziehungen zu der DNA-Polymerase α , des HSV- und des Vaccinia-Virus. Die DNA-Polymerase des Eukaryonten infizierenden Adenovirus dagegen, die wie die DNA-Polymerase von den Phagen Phi29 und PRD1 mit einem terminalen Protein zusammenarbeitet, zeigt sowohl zu diesen als auch zu der des HSV- und Vaccinia-Virus Homologie. Die DNA-Polymerase α , des HSV- und Vaccinia-Virus bilden eine mehr oder weniger einheitliche Gruppe, die interessante Querverbindungen zu den DNA-Polymerasen der Plasmide pGK11 und pGK12 (*K. lactis*) zeigt. Es gibt einen homologen Bereich zwischen der DNA-Polymerase α sowie der vom HSV-Virus und der von pGK11 bzw. zwischen der von pGK12 und der DNA-Polymerase α . Es könnte sein, daß ein Zusammenhang zu der nicht-mitochondrialen Lokalisation der Plasmide von *K. lactis* besteht.

Die recht hohe Homologie der DNA-Polymerasen nachgewiesenermaßen mitochondrialer Plasmide (S1 - *Z. mays* und pCIK1 - *C. purpurea*) zu denen von Bakteriophagen (s. Anhang B oder Tab.4) bildet die Grundlage für eine spekulative These. Auf der einen Seite diskutiert man die Möglichkeit, daß die linearen Plasmide der Bakterie *Streptomyces clavuligerus* mit defekten oder temperenten Bakteriophagen identisch sind (Keen et al. 1988). Auf der anderen Seite nimmt die Endosymbiontentheorie einen prokaryontischen Ursprung der Mitochondrien an.

Die Endosymbiontentheorie ist die weitverbreiteste Theorie zum Ursprung der Organellen. Nach ihr stammen Chloroplasten und Mitochondrien von in Eukaryonten eingewanderten Prokaryonten ab (Gray 1983, Ebringer und Krajcovic 1986, Pace et al. 1986). Der Ursprung der Mitochondrien liegt eventuell in einer Abteilung der Purpurbakterien, zu denen die Rhizobakterien, Agrobakterien und die Rickettsien gehören. Diese Prokaryonten leben in oder in enger Assoziation mit eukaryontischen Zellen (Yang et al. 1985).

Folglich wäre es vorstellbar, daß einige mitochondriale Plasmide von Bakteriophagen abstammen, deren prokaryontischer Wirt in Eukaryonten eingewandert ist.

Allerdings beruht die Bedeutung der Aminosäurehomologie aller DNA-Polymerasen der Familie B letztendlich darauf, ob die Homologie auf tatsächlich vorhandene Verwandtschaftsbeziehungen oder auf einer Konvergenz von Polymerasen, die ähnliche Sequenzen für ähnliche Funktionen benutzen, beruht. Ein gemeinsamer Ursprung von DNA-Polymerasen, die alle replikativ sind, aber in phylogenetisch unterschiedlichen Species und verschiedenen Zellorganellen vorkommen, ist denkbar, da die Homologieverhältnisse sich in den phylogenetischen Zusammenhang - soweit er bekannt ist - einordnen lassen. Er sollte jedoch durch den Fund von "Übergangsformen" untermauert werden. Zudem bleibt abzuwarten, ob sich die heutige Einteilung in DNA-Polymerasen-Familien nach Strukturanalyse von Familie B-DNA-Polymerasen aufrecht halten läßt.

5.3.2 Vergleich des möglichen URF2-Produktes von pClK1 zu RNA-Polymerasen

Die meisten der bekannten RNA-Polymerasen sind komplex. Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten. Das gilt für die eukaryontischen RNA-Polymerasen I, II und III, die im Kern lokalisiert sind, für die RNA-Polymerasen der Chloroplasten und von *E. coli*. Allen ist ein Kern aus den Untereinheiten $\alpha\alpha\beta\beta'$ gemeinsam. Die Untereinheiten zeigen – soweit sie untersucht wurden – zwischen den verschiedenen Organismen sogar Homologie auf Aminosäureebene (Sweetser et al. 1987, Hudson et al. 1988, Armaleo 1987).

Die einzige bis dato bekannte Sequenz einer mitochondrialen RNA-Polymerase (*S. cerevisiae*) dagegen besteht wahrscheinlich aus einer Polypeptidkette und besitzt große Homologie zu den ebenfalls einfach gebauten RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 und SP6 (Masters et al. 1987). Auf Grund von Aminosäurehomologien muß man auch das noch nicht weiter charakterisierte URF1-Produkt des Plasmides S2 (*Z. mays*) diesen RNA-Polymerasen zuordnen (Kuzmin et al. 1988). Während die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen sehr selektiv ihren Promotor erkennen, scheinen die mitochondrialen RNA-Polymerasen ihre Selektivität in der Promotorerkennung erst durch einen zusätzlichen Faktor zu gewinnen. Das ergaben Untersuchungen an den mitochondrialen RNA-Polymerasen von Hefe und Mensch (Fisher et al. 1987, Schinkel et al. 1986).

Der Versuch diesen Faktor der RNA-Polymerase von *S. cerevisiae* zu isolieren, führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Ticho und Getz (1988) fanden ein Protein von 70 kD, während Schinkel et al. (1988) ein 43 kD-Protein isolierten. Beide Proteine scheinen mit dem gesuchten Faktor die Eigenschaft zu teilen, daß sie der RNA-Polymerase bei der Promotor-Erkennung helfen, obgleich sie sich dabei in der Art und Weise zu unterscheiden scheinen.

Das mögliche URF2-Produkt des Plasmides pClK1 zeigt eindeutig Homologie zu den einfach gebauten RNA-Polymerasen – also auch zu der mt RNA-Polymerase von *S. cerevisiae* (s. Abb.10). Da das Plasmid pClK1 in den Mitochondrien lokalisiert ist – es wird von einer DNase-Behandlung isolierter Mitochondrien nicht beschädigt – liegt der Verdacht nahe, es könnte sich bei dem URF2-Produkt von pClK1 um die mt RNA-Polymerase von *Claviceps* handeln. Da der vom Plasmid pClK1 geheilte *Claviceps*-Stamm K jedoch unvermindert lebensfähig ist (Düvell et al. 1988), sollte man dieses ausschließen können. *Claviceps* ist ein obligater Aerobier und würde ohne funktionstüchtige Mitochondrien nicht überleben. Für funktionierende Mitochondrien wiederum ist eine dort wirkende RNA-Polymerase nötig.

Betrachtet man die Homologie des möglichen URF2-Produktes von pClK1 zu den anderen RNA-Polymerasen, so ist sie in Bezug auf die mt RNA-Polymerase und die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen in etwa gleich (s. Tab.5). Die Homologie des möglichen URF2-Produktes von pClK1 zur RNA-Polymerase von S2 (*Z. mays*) ist

recht gering (s. Tab.5). Im Gegensatz dazu steht die hohe Homologie des möglichen URF1-Produktes von pCIK1 zur DNA-Polymerase von S1 (Z. mays) - dem gemeinsam mit S2 auftretenden Plasmid. Vergleicht man die RNA-Polymerasen unter denselben Bedingungen wie die DNA-Polymerasen (s. S.24), findet man zwischen URF2 von pCIK1 und der RNA-Polymerase von S2 eine homologe Region von 34 Aminosäuren (38% Homologie) und eine zweite von 37 Aminosäuren (41% Homologie). Dagegen ist die Homologie zwischen URF1 von pCIK1 und der DNA-Polymerase von S1 deutlich größer. Man findet eine homologe Region von 69 Aminosäuren (49% Homologie) und eine weitere von 256 Aminosäuren (37% Homologie) (s. Anhang B). Allerdings ist die Homologie des URF2-Produktes von pCIK1 zur RNA-Polymerase von S2 in einem kleinen Bereich (Abb.10 Block V) größer als zu den anderen RNA-Polymerasen.

Es fällt auf, daß der äußere Aufbau der RNA-Polymerasen bis auf die mitochondriale von S. cerevisiae sehr einheitlich aussieht (s. Abb.10). Die mt RNA-Polymerase von S. cerevisiae zeichnet sich durch einen größeren, nicht homologen Amino-terminalen Teil aus. Da sie offenbar mit einem Faktor für die Promotorerkennung zusammenarbeitet, könnte hier eine Region für die Wechselwirkung mit diesem Faktor liegen. Dagegen spricht nicht unbedingt, daß von den alleine agierenden RNA-Polymerasen der Phagen T3 und T7 vermutet wird, daß der Carboxy-terminale Teil des Enzymes eine Rolle in der Promotorerkennung spielt (Morris et al. 1987).

Ob bei den Homologien der hier beschriebenen RNA-Polymerasen verwandtschaftliche Beziehungen eine Rolle spielen, ist noch nicht abzuschätzen, da die Anzahl der zueinander homologen RNA-Polymerasen einfachen Baues noch zu gering ist.

5.3.3 Codongebrauch der beiden großen URFs von pCIK1

Tab.6 zeigt den Codongebrauch der beiden großen URFs - URF1 und URF2 - von pCIK1. Da der Codongebrauch mitochondrialer Gene von C. purpurea unbekannt ist, wurde der dem Mutterkornpilz systematisch nahe stehende Ascomycet N. crassa als Vergleichssystem herangezogen. Dort beobachtet man eine Bevorzugung von T und A an dritter Stelle der Codone in den Strukturgenen der hmw mtDNA. Außerdem sind eine Reihe von Codonen unterrepräsentiert: CGN - Arg, TGG - Trp, ACC und ACG - Thr, GTC - Val, CCG - Pro und CTC - Leu (Nelson und Macino 1985, Nelson und Macino 1987, Aota et al. 1988).

Sowohl in URF1 als auch in URF2 findet man eine Bevorzugung von T und A an dritter Stelle eines Codons. Diese Bevorzugung ist sicherlich zum Teil auf den hohen AT-Gehalt des Plasmides pCIK1 zurückzuführen. Im Vergleich zu N. crassa wird das Codon GTC nicht im selben Ausmaße gemieden. Alle anderen in mitochondrialen Genen von N. crassa selten benutzten Codone werden auch im URF1 bzw. URF2 von pCIK1 seltener benutzt.

URF1

TTT Phe 22	TCT Ser 19	TAT Tyr 41	TGT Cys 5
TTC " 16	TCC " 6	TAC " 15	TGC " 4
TTA Leu 52	TCA " 5	TAA Ter 1	TGA Trp 3
TTG " 15	TGG " 2	TAG " 0	TGG " 1
CTT Leu 22	CCT Pro 15	CAT His 13	CGT Arg 5
CTC " 4	CCC " 2	CAC " 4	CGC " 0
CTA " 28	CCA " 6	CAA Gln 21	CGA " 0
CTG " 7	CCG " 4	CAG " 12	CGG " 0
ATT Ile 30	ACT Thr 36	AAT Asn 35	AGT Ser 15
ATC " 19	ACC " 7	AAC " 30	AGC " 3
ATA " 32	ACA " 9	AAA Lys 61	AGA Arg 14
ATG Met 26	ACG " 4	AAG " 34	AGG " 2
GTT Val 17	GCT Ala 33	GAT Asp 43	GGT Gly 14
GTC " 8	GCC " 4	GAC " 14	GGC " 6
GTA " 15	GCA " 6	GAA Glu 30	GGA " 5
GTG " 4	GCG " 7	GAG " 18	GGG " 6

URF2

TTT Phe 37	TCT Ser 14	TAT Tyr 44	TGT Cys 7
TTC " 26	TCC " 6	TAC " 12	TGC " 5
TTA Leu 36	TCA " 8	TAA Ter 1	TGA Trp 7
TTG " 13	TGG " 2	TAG " 0	TGG " 0
CTT Leu 19	CCT Pro 17	CAT His 12	CGT Arg 9
CTC " 8	CCC " 3	CAC " 6	CGC " 2
CTA " 32	CCA " 10	CAA Gln 13	CGA " 0
CTG " 10	CCG " 7	CAG " 3	CGG " 0
ATT Ile 22	ACT Thr 42	AAT Asn 48	AGT Ser 22
ATC " 15	ACC " 4	AAC " 29	AGC " 8
ATA " 41	ACA " 25	AAA Lys 73	AGA Arg 31
ATG Met 19	ACG " 5	AAG " 26	AGG " 0
GTT Val 13	GCT Ala 21	GAT Asp 46	GGT Gly 20
GTC " 12	GCC " 6	GAC " 21	GGC " 11
GTA " 22	GCA " 15	GAA Glu 41	GGA " 15
GTG " 13	GCG " 3	GAG " 22	GGG " 4

Tab.6 Codongebrauch von URF1 (links) und URF2 (rechts) des Plasmides pCIK1

5.3.4 URF3, URF4, URF5 und URF6

Für die zwischen 100 und 120 Aminosäuren großen möglichen Produkte von URF3, URF4, URF5 und URF6 des Plasmides pCIK1 konnte keine Funktion auf Grund von Aminosäurehomologien zu bekannten Proteinen gefunden werden. Auch konnte keine Homologie zu möglichen kleinen URFs der sequenzierten linearen Plasmide S1, S2 (Z. mays) und pGK11, pGK12 (K. lactis) festgestellt werden.

Trotzdem ist es denkbar, daß alle kleinen URFs von pCIK1 eine Funktion besitzen, daß sie transkribiert und translatiert werden:

- 1) Ihre Größe - um 100 Aminosäuren - gilt als signifikant dafür, daß sie eventuell für ein Protein codieren könnten. Allerdings muß man einräumen, daß sowohl URF4 als auch URF6 nur unter der Voraussetzung existieren, daß das ATG-Codon nicht das einzig mögliche mitochondriale Translations-Startcodon filamentöser Pilze ist (s. S.22).
- 2) Das Produkt von URF3 und von URF6 wäre ein fast durchweg hydrophobes Protein (s. Abb.11). Es handelt sich möglicherweise um Membranproteine. Damit besitzen sie vermutlich keine Funktion für das Plasmid selber (Replikation, Transkription), sondern könnten für den Pilz Claviceps von Bedeutung sein. Da der das Plasmid pCIK1 ansonsten enthaltende Stamm K nach einem "Curing" keine auffallenden phänotypischen Ausfallserscheinungen in axenischer Kultur zeigt (Düvell et al. 1988), kann das URF3- bzw. URF6-Produkt nicht lebensnotwendig sein, sondern ist vermutlich nur in bestimmten Lebensabschnitten wichtig.
- 3) Das URF4- und das URF5-Produkt besitzen keine so auffälligen Hydropathieprofile, die auf ihren möglichen Wirkort hinweisen. Als Hinweis darauf, daß zumindest URF5 eine Funktion besitzt, ist eventuell seine Konservierung in dem zu pCIK1-homologen Fragment der hmw mtDNA des Stammes W3 (URFa) zu werten. Das Produkt von URFa unterscheidet sich hauptsächlich durch eine Inser-

tion von 22 Aminosäuren im Amino-terminalen Teil vom URF5-Produkt (s. Abb. 17).

Keines der vier möglichen URF-Produkte ist vermutlich mit dem terminalen Protein von pCIK1 identisch, da allen die charakteristische Konstellation einer bestimmten Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) in einem hydrophilen Bereich, der dort die Sekundärstruktur eines "β-turns" besitzt, fehlt (s. S.29). Darüber hinaus spricht beim URF3- und URF6-Produkt ihre Hydrophobie gegen eine Identität mit dem terminalen Protein, da alle bekannten terminalen Proteine überwiegend hydrophil sind.

5.3.5 Codierung des terminalen Proteins

Ähnlich wie das Plasmid pCIK1 strukturierte Viren (lineares Genom, TIR, 5'-gebundene terminale Proteine) codieren selber für ihr terminales Protein. Die Größe von bekannten terminalen Proteinen ist recht unterschiedlich:

- Die Adenoviren besitzen ein Vorläuferprotein von 80 kD, das in ein Protein von 55 kD prozessiert wird (Smart und Stillman 1982, Campbell 1986).
- Die terminalen Proteine der Bacillus-Phagen Phi29, Nf und PZA sind 31 kD groß und besitzen untereinander 60% Homologie, obgleich terminale Proteine ansonsten keine Homologie zueinander zeigen (Leavitt und Ito 1987). Die Homologie der terminalen Proteine der Bacillus-Phagen liegt vermutlich darin begründet, daß sie einen gemeinsamen Wirt haben.
- Die Phagen PRD1 und Cp-1 besitzen vergleichbar große terminale Proteine von 29 kD bzw. 28 kD (Hsieh et al. 1987, Savilahti und Bamford 1987, Garcia et al. 1983).

Die Größe terminaler Proteine von linearen Plasmiden wurde bislang nur bei den Plasmiden von K. lactis bestimmt: pGK11 - 28 kD, pGK12 - 36 kD (Stam et al. 1986). Es wird vermutet, daß die terminalen Proteine der Plasmide pGK11 und pGK12 von pGK12 codiert werden, da man auf pGK12 URFs gefunden hat, denen man keine Funktion zuweisen konnte und die entsprechend große oder größere Proteine codieren könnten (Tommasino et al. 1988).

Folglich ist es wahrscheinlich, daß auch das Plasmid pCIK1 für sein terminales Protein codiert, doch ist zum einen jedes der vermutlichen Produkte der vier kleinen URFs von pCIK1 kleiner als die beschriebenen terminalen Proteine und zum anderen weist keines eine Aminosäure auf, die die Merkmale einer Nukleotid-verknüpften Aminosäure bekannter terminaler Proteine besitzt (s. S.29). Für seine Codierung sind folgende Möglichkeiten denkbar:

- 1) Das Plasmid pCIK1 besitzt Intronen. Falls das mitochondrial lokalisierte Plasmid pCIK1 funktionierende Intronen besitzen sollte, würde man annehmen, daß sie im mitochondrialen System verständlich sind. In den Mitochondrien findet man Intronen der Klasse I und II, die sich durch Konsensussequenzen und eine be-

stimmte Sekundärstruktur auszeichnen (Michel und Dujon 1983).

Es gibt drei Gruppen von Intronen. Die erste umfaßt Intronen der nukleären mRNA, die zweite Intronen von nukleären tRNA-Genen und die dritte Intronen von mitochondrialen und Chloroplasten-Genen sowie von rRNA-Genen niedriger Eukaryonten. Die dritte Gruppe wird auf Grund von Sequenzmotiven und Sekundärstrukturen noch in die Klassen I und II unterteilt (Sharp 1985, Cech 1986, Michel und Dujon 1983).

Doch das Plasmid pClK1 besitzt keine Region, die sowohl alle Konsensussequenzen als auch die Sekundärstruktur einer der beiden Intronklassen aufweist. Folglich fällt diese Möglichkeit wahrscheinlich weg.

- 2) Es ist erheblich kleiner als die bislang beschriebenen terminalen Proteine. Eventuell könnte es auch nur Peptidgröße besitzen. Zumindest besitzen die terminalen Proteine von Adenoviren und Bacillus-Phagen selber keine katalytische Aktivität. Die kovalente Bindung zwischen dem terminalen Protein und dem Nukleotid, das als Startpunkt für die Replikation benutzt wird, wird von der DNA-Polymerase der Viren katalysiert (Vartapetyan 1987).
- 3) Das Gen für das terminale Protein könnte Bestandteil eines größeren URFs von pClK1 sein und aus diesem entweder auf Transkript- oder Proteinebene hervorgehen. Auf Transkriptebene müßte man entweder zwei verschieden lange Transkripte des gleichen URFs fordern oder ein nicht immer benutztes spezifisches Signal für einen Translations-Stopp innerhalb des vollen Transkriptes. Auf Proteinebene könnte man sich ein Protein-Processing vorstellen, wie es z.B. beim Ty-Element von S. cerevisiae verwendet wird (Kingsman und Kingsman 1988). Während die RNA-Polymerasen fast alle gleich groß sind – soweit bekannt besitzt nur die mt RNA-Polymerase einen größeren Amino-terminalen Teil als die anderen –, gibt es ziemliche Größenunterschiede bei den DNA-Polymerasen – so sind die DNA-Polymerasen der Bakteriophagen Phi29 und PRD1 nur halb so groß wie die meisten anderen bislang beschriebenen (s. Abb.9 und Abb.10). Folglich wäre es denkbar, daß der Amino-terminale Teil der DNA-Polymerase von pClK1 auch als eigenständiges Protein eine Funktion besitzt. Ungefähr die ersten 400 Aminosäuren könnten zu einem kleineren Protein gehören. Interessanterweise scheint das mögliche URF1-Produkt in Position 327 ein Serin zu besitzen, das alle auf Seite 29 angesprochenen strukturellen Bedingungen für die das Nukleotid bindende Aminosäure erfüllt.
- 4) Ein URF für das terminale Protein könnte auf dem Plasmid pClK1 eventuell nur sehr schwer zu finden sein, wenn ein oder mehrere Stopp-Codone durch translationales "frame shifting" übergangen werden (Craigie und Caskey 1987). Eine ähnlich schwer zu durchschauende Situation entstünde bei "RNA-editing", das in den Mitochondrien von Trypanosomen beobachtet wurde. Bei einigen Genen dort scheint erst das posttranskriptionelle Einfügen bzw. Entfernen von Uridin in das Transkript zu translatierbaren Sequenzen zu führen (Eisen 1988, Maizels und Weiner 1988).
- 5) Es wird von der hmw mtDNA oder sogar von der nukleären DNA codiert.

Zur Klärung der Codierung des terminalen Proteins sollte man versuchen, das Protein zu isolieren und seinen Ursprung zu verfolgen.

Dabei würde direkt nachgewiesen, daß pClk1 tatsächlich ein 5'-gebundenes terminales Protein besitzt. Der Besitz ist recht wahrscheinlich, da die Plasmid-Enden gegen eine Lambda-Exonuklease-Behandlung (5'-3'-Richtung des Nukleotid-Abbaues) unempfindlich sind und da für eine effiziente Plasmidaufarbeitung eine frühe ProteinaseK-Behandlung nötig ist (Düvell et al. 1988). Zwar wird auch eine Alternative für die Endstruktur eines linearen Plasmides beschrieben, doch gibt es für eine ähnliche Struktur bei pClk1 keine Hinweise. Von einem Abkömmling des Plasmides pGK11 (*K. lactis*) ist wird berichtet, daß ein Plasmid-Ende dem des normalen Plasmides gleicht, während das andere einen kovalent geschlossenen "hairpin-loop" bildet. Das Ende mit dem "hairpin-loop" widersteht sowohl einem Abbau in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung. Auf denaturierenden Gelen läuft das Plasmid bei doppelter Größe (Gunge 1986).

5.3.6 Vergleich der Codierungskapazität von pClk1 mit der anderer linearer Plasmide

Für einen Vergleich der Codierungskapazität von pClk1 (6752 bp) bieten sich die linearen Plasmide an, deren Sequenz vollständig bekannt ist:

- 1) S1 (6397 bp) und S2 (5452 bp) (*Z. mays*) (Paillard et al. 1985, Levings III und Sederoff 1983):

Die S-Plasmide kommen zusammen vor. S1 besitzt einen URF mit Homologie zu DNA-Polymerasen und S2 einen mit Homologie zu RNA-Polymerasen. Ein weiterer größerer URF liegt in dem zwischen S1 und S2 identischen Bereich von 1462 bp. Daneben gibt es noch kleinere URFs.

- 2) pGK11 (8874 bp) und pGK12 (13457 bp) (*K. lactis*) (Stark et al. 1984, Sor und Fukuhara 1985, Tommasino et al. 1988):

Die beiden Plasmide treten im Normalfall gemeinsam auf. Für alle größeren URFs von pGK11 wurde eine Funktion gefunden: DNA-Polymerase, Killertoxine, Immunität. Auf pGK12 wurden fünf große URFs gefunden, von denen einer vermutlich ebenfalls für eine DNA-Polymerase codiert. Die Funktion der anderen ist unbekannt. Interessant ist, daß einer dieser URFs eine Homologie zu der β -Untereinheit komplex aufgebauter RNA-Polymerasen (*E. coli*, Chloroplasten, Zellkern) zu zeigen scheint (Ergebnis eigener Untersuchungen). Auch die Plasmide pGK11 und pGK12 besitzen noch einige kleinere URFs.

Zum einen fällt auf, daß in allen drei Systemen eine eigene DNA-Polymerase und eventuell auch in allen eine eigene RNA-Polymerase codiert wird. Auf der anderen Seite gibt es ein Potential weiterer URFs, deren Funktion zumeist unbekannt ist. Möglicherweise wird von ihnen ein terminales Protein codiert. Andererseits könnten sie für Funktionen codieren, die über die Sicherung der Plasmid-Transkription und -Replikation hinausgehen. Die Killertoxin-URFs und der Immunitäts-URF von pGK11 illustrieren diese Möglichkeit.

Auch die Codierungskapazität des Kalilo-Plasmides (*N. intermedia*) scheint vergleichbar zu sein. Es gibt zwei URFs: einen URF mit Homologie zu

DNA-Polymerasen und einen zweiten mit Homologie zu RNA-Polymerasen (Bertrand pers. Mitteil.).

Im Vergleich zu den paarweise auftretenden S-Plasmiden (*Z. mays*) und "Killerplasmiden" (*K. lactis*) scheint die Codierungskapazität von pClK1 geringer. Neben dem DNA- und RNA-Polymerase-URF besitzt es nur noch kleinere URFs, während die anderen Plasmide noch weitere größere URFs besitzen. Ob die kleineren URFs in den Plasmiden eine Funktion haben, ist unbekannt, jedoch nicht auszuschließen. Mit sinkender Basenzahl nimmt zwar die Signifikanz eines URFs ab, doch wird es gleichzeitig schwieriger, eine Homologie oder eine Funktion nachzuweisen.

5.4 Korrelation der Ergebnisse von Sequenzanalyse und Transkriptanalyse

Die Existenz von URFs auf pClK1 alleine besagt noch nicht, daß sie auch transkribiert und translatiert werden. Ihre Translation soll in Zukunft untersucht werden. Zu der Transkription existieren bereits einige Daten. Hier soll versucht werden, die Ergebnisse der Transkriptanalyse von pClK1 (Düvell 1988) mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse zu korrelieren.

Es wurden zwei Haupttranskripte von 3,5 bzw. 3,15 kb gefunden. Ihre Kartierung ergab, daß das 3,5 kb-Transkript mit einer Transkription von URF1 ("DNA-Polymerase"-URF) und das 3,15 kb-Transkript mit einer Transkription von URF2 ("RNA-Polymerase"-URF) korrespondiert.

Dabei wurde das 5'-Ende der Transkripte genauer kartiert. Berücksichtigt man die begrenzte Schärfe der benutzten Methode liegt das 5'-Ende des kleineren Transkriptes zwischen Nukleotid 50 und 130 auf dem oberen Strang (Position s. Abb.3). Für das größere Transkript wurden zwei 5'-Endbereiche bestimmt: 6195-6305 und 6395-6460 auf dem unteren Strang (Position s. Abb.3), von denen der als letztes genannte offenbar stärker vertreten war.

Alle drei Bereiche wurden auf das Vorhandensein eines mitochondrialen Promotors hin untersucht. Sequenzen von vermutlichen mitochondrialen Promotoren sind - abgesehen von Wirbeltieren - für *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Torulopsis globrata* und *Z. mays* beschrieben. Dort findet man die Sequenz "ATAAGTA" als minimale Konsensussequenz (Osinga et al. 1982, Clark-Walker et al. 1985, Isaac et al. 1985). Abweichungen um eine Base sind möglich. Unter dieser Bedingung findet man die "Promotor"-Sequenz 21mal auf dem oberen und 20mal auf dem unteren Strang, doch nie in einem der drei oben angegebenen Bereiche. Ein ähnliches Ergebnis fanden Traynor und Levings III (1986) bei ihrer 5'-Kartierung der Transkripte des Plasmides S2 (*Z. mays*). Auch sie konnten die 5'-Enden der S2-Transkripte nicht mit einer mit Promotorsequenz korrelieren.

Die S2-Transkripte wurden an einander entsprechender Lage im TIR kartiert, während die Kartierungs-Bereiche der beiden stärker vertretenen 5'-Enden der pClK1-Transkripte zwar zum größten Teil innerhalb des TIR liegen, aber eindeutig in ver-

schiedenen Bereichen in Bezug auf das Plasmid-Ende liegen. Für dieses Kartierungsergebnis könnte es eine interessante Erklärung geben. Bei den Bakteriophagen T3, T7 und SP6 wird die Expression ihrer frühen und späten Gene durch die Promotor-Selektivität ihrer RNA-Polymerase, zu der das URF2-Produkt von pClK1 Homologie zeigt, koordiniert. Das RNA-Polymerase-Gen und andere frühe Gene dieser Bakteriophagen werden nach der Infektion ihres Wirtes von der Wirts-RNA-Polymerase transkribiert. Die Phagen-RNA-Polymerase transkribiert dann späte Gene des Phagen, deren Promotor nur von der Phagen-RNA-Polymerase erkannt wird (Bailey et al. 1983). In Analogie dazu könnten URF1 und URF2 von pClK1 zwei verschiedene Promotoren besitzen. Der Promotor des "RNA-Polymerase"-URFs würde von der mitochondrialen RNA-Polymerase von C. purpurea erkannt, während der Promotor des "DNA-Polymerase"-URFs nur von der Plasmid-codierten RNA-Polymerase erkannt würde.

Ob zu dem größeren Transkript, das URF1 zugeordnet wurde, tatsächlich zwei 5'-Enden gehören, müßte noch geklärt werden, da neben den beiden Haupttranskripten noch kleinere Transkripte existieren, deren Lokalisation bislang nicht festgelegt werden konnte. Zumindest zwei geringer vertretende Transkripte - 2,85 kb und 1,7 kb - kann man nachweisen. Ihre Existenz ist nicht auf weitere größere Leserahmen neben URF1 und URF2 zurückzuführen. Auch Intronen fallen wahrscheinlich als Erklärungsmöglichkeit aus (s. Kap.10.3.5). Die Möglichkeit, das ein URF doppelt benutzt wird, könnte dazu führen, daß zwei oder mehrere Transkripte in einer Region existieren. Diese Möglichkeit wurde im Zusammenhang mit der Codierung des terminalen Proteins diskutiert (s. Kap.10.3.5).

Andere Erklärungsmöglichkeiten wären:

- 1) Das Plasmid pClK1 codiert für größere RNA-Moleküle, deren Sequenz und Funktion bislang noch unbekannt sind. Eine Homologie zwischen pClK1 und bekannten RNA-Molekülen konnte nicht gefunden werden.
- 2) Die kleineren URFs, deren Transkription bislang nicht nachgewiesen wurde, werden mit einem langem nichttranslatierten 5'- und/oder 3'-Bereich transkribiert. Der nicht transkribierte Bereich müßte nicht unbedingt zu pClK1 homolog sein. So würden sich eventuell auch die Schwierigkeiten bei der Lokalisation dieser Transkripte erklären.
- 3) Da alle URFs von pClK1 jeweils nur in einem der drei möglichen Leserahmen des oberen bzw. des unteren Stranges zu liegen scheinen (s. Abb.8), wäre es denkbar, daß sowohl der obere als auch der untere Strang von einem im TIR gelegenen Promotor als Ganzes transkribiert wird. Die gefundenen Transkripte entsprächen dann Prozessierungsprodukten, die offenbar unterschiedliche Stabilität, d.h. Lebensdauer, besäßen - je nachdem ob sie in ein Protein translatiert werden oder nicht.

Zu einer endgültigen Klärung der Transkription von pClK1 müßte es gelingen, auch eine Kartierung der weniger auftretenden Transkripte durchzuführen.

5.5 Homologie von Claviceps-Plasmiden zur hmw mtDNA: Erklärungsversuch anhand eines Beispiels

Das Plasmid pClK1 aus dem Stamm K zeigt keine Homologie zu seiner eigenen hmw mtDNA. Andere Stämme dagegen besitzen zu pClK1 homologe Sequenzen in ihrer hmw mtDNA. Diese Situation ist nicht völlig einzigartig für ein lineares Plasmid.

Eine analoge Situation findet man bei dem mitochondrialem 2,3 kb Plasmid aus Mais, das keine Homologie zur hmw mtDNA von Mais zeigt, aber zur hmw mtDNA der Mais' verwandten Teosinte Homologie besitzt. Allerdings scheint die Homologie hauptsächlich auf eine zur Chloroplasten-DNA (cpDNA) homologen Region zurückzuführen zu sein, die sowohl im Plasmid als auch der hmw mtDNA von Teosinte vorkommt (Bedinger et al. 1986). Ein anderes mtPlasmid höherer Pflanzen - das 11,3 kb Plasmid von Bras-sica - kommt in B. napus und B. campestris vor, zu deren hmw mtDNA keine Homologie besteht. "Integrierte" Plasmidregionen findet man in der hmw mtDNA von Raphanus sativus und B. oleracea. Auch dieses Plasmid besitzt zumindest eine gewisse Homologie zur cpDNA (Turpen et al. 1987). In den Mitochondrien des Pilzes A. bitorquis findet man die linearen Plasmide pEM und pMPJ. In Plasmid-haltigen Stämmen existiert keine Homologie zur hmw mtDNA. In Stämmen, die das Plasmid pEM nicht besitzen, wurde Homologie zwischen der hmw mtDNA und dem Plasmid pEM gefunden (Mohan M, Meyer RJ, Hintz W, Anderson JB, Horgen PA, Poster auf dem "First International Congress of Plant Molecular Biology", Savannah (USA) 1985).

Solche Homologien scheinen ein Relikt der Anwesenheit des betreffenden Elementes bzw. eines ihm ähnlichen darzustellen. Im Fall des Plasmides pClK1 konnte in einigen Stämmen (T5, T6, T9a, 13/46, Bay4, W7, W3) ein Fragment beobachtet werden, daß sowohl Homologie zu pClK1 als auch Homologie zum 5'-Bereich des lrRNA-Genes besitzt (Tudzynski et al. 1986, Tudzynski und Esser 1986, Tudzynski pers. Mitteil.). Es gibt jedoch auch andere Insertionsorte von Claviceps-Plasmiden in der hmw mtDNA (Tudzynski und Esser 1986, Tudzynski pers. Mitteil.).

Die Homologie von pClK1 zur hmw mtDNA von W3 wurde näher charakterisiert. Southern- und Restriktionsanalyse gaben erste Hinweise darauf, daß die Homologie von pClK1 nicht innerhalb des lrRNA-Genes lag und daß sie dem rechten Ende von pClK1 entspricht. Eine Sequenzierung der Region bestätigte die vorhergehenden Analysen (Schema s. Abb.20). Das 5'-Ende des lrRNA-Genes konnte auf Grund seiner Homologie zum gut charakterisierten lrRNA-Gen von A. nidulans (Dyson et al. 1988) lokalisiert werden. 243 Basen stromaufwärts vom lrRNA-Gen liegt eine Region mit hoher Homologie zu pClK1.

Für die 243 Basen zwischen dem vermutlichen 5'-Ende des lrRNA-Genes und der pClK1-homologen Region konnte keine Homologie zu bekannten Sequenzen gefunden werden. Es gibt jedoch eine Homologie der Basen 1304-1312 (s. Abb.16) zu der Sequenz $C/\tau C/\tau A^A/cNA^A/gA^A/\tau G$, die in N. crassa auf Grund einer in vitro-Transkription dreier mitochondrialer Gene - darunter auch des lrRNA-Genes - als mögliche Konsensussequenz eines mitochondrialen Promotors von N. crassa erscheint (Lambowitz pers. Mitteil.). Da N. crassa und C. purpurea nahe verwandt sind, könnte diese 9 bp große Sequenz, die 160 bp vor dem vermutlichen

5'-Ende des lrRNA-Genes liegt, mit dem Promotor des Genes identisch sein. Damit würde der Abstand des lrRNA-Genes zur pClK1-homologen Region nur noch 74 bp betragen.

In Bezug auf eine Transkription des Plasmides pClK1 ist es interessant, daß diese 9 bp-große Sequenz zwar innerhalb des Plasmides auftritt, aber nicht in den Bereichen, in denen 5'-Enden von pClK1-Transkripten kartiert wurden (s. S.50).

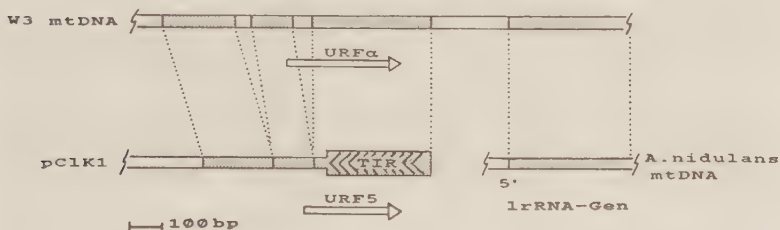


Abb.20

Schema des sequenzierten hmw mtDNA-Bereiches von W3. Die zueinander homologen Abschnitte der W3 mtDNA und des Plasmides pClK1 (Stamm K) sowie der W3 mtDNA und des lrRNA-Genes von *A. nidulans* sind markiert. Die Lage der homologen URFs (URFa und URF5) ist durch Pfeile dargestellt.

Die pClK1-homologe Region der mtDNA von W3 ist 0,82 kb groß und entspricht einem 0,72 kb Fragment von pClK1, das auch den rechten TIR vollständig umfaßt. Der Größenunterschied von ca. 0,1 kb beruht hauptsächlich auf zwei "Insertionen" von 39 bzw. 66 bp in die hmw mtDNA von W3. Daneben unterscheiden sich beide Sequenzen nur geringfügig (95% Homologie). Diese hohe Homologie auf Sequenzebene bestätigt die Vermutung, daß die Homologie von den Claviceps-Plasmiden zu der hmw mtDNA auf Rekombination beruht.

Die geringen Unterschiede beider Sequenzen führen dazu, daß sowohl der Beginn des URF1 von pClK1 als auch die konservierte 10 bp-Sequenz, die bei menschlichen Adenoviren für die Initiation der Replikation essentiell ist, in der hmw mtDNA nicht zu finden sind. URF5 von pClK1 ist allerdings in Form des URFa konserviert. Seine Funktion ist unbekannt.

Da pClK1 nicht im Stamm W3 vorkommt, ist es schwer zu beurteilen, welche Bedeutung diesen geringen Unterschieden und den beiden kurzen Sequenzen von 39 bp bzw. von 66 bp, die die Homologie der W3 mtDNA zu pClK1 unterbrechen (s. Abb.20), beizumessen ist. Der Stamm W3 besaß zu Beginn der Untersuchungen lineare Plasmide, die im Laufe der Weiterzucht von axenischen Kulturen verloren gingen – ein Hinweis darauf, daß Plasmide in *C. purpurea* für den Pilz nicht lebensnotwendig sind. Zumindest eines der Plasmide besaß Homologie zu pClK1. Wahrscheinlich führte ein Rekombinationsereignis zwischen diesem zu pClK1 homologen Plasmid und der hmw mtDNA zu dem plasmid-homologen Bereich in der hmw

mtDNA von W3. Gegen mehrere Rekombinationsereignisse spricht die kolineare Anordnung der zwischen pCIK1 und der W3 mtDNA gefundenen homologen Bereiche (s. Abb.20). Desweiteren stellt sich die Frage, ob die gefundene Teilinsertion eines Claviceps-Plasmides tatsächlich die direkte Folge einer Rekombination darstellt oder ob sie nur einem Relikt einer Integration eines ganzen Plasmides entspricht. Für das erstere spricht, daß bislang kein Beispiel für ein insgesamt integriertes Claviceps-Plasmid gefunden wurde (s. S.4).

Folglich kann man zwei Punkte als gegeben annehmen:

- 1) Die Unterschiede zwischen pCIK1 und dem homologen Bereich der hmw mtDNA beruhen entweder auf Unterschieden zwischen den Plasmiden des Stammes K und des Stammes W3 und/oder Veränderungen der integrierten Sequenz.
- 2) Die linke bzw. rechte Grenze des zu pCIK1 homologen Bereiches der W3 mtDNA (s.Kap.4.3) stimmt mit einer linken bzw. rechten "Rekombinationsgrenze" überein. Unter diesen Prämissen wurden die folgenden Überlegungen angestellt.

Benachbart der pCIK1-homologen Region in der hmw mtDNA von W3 gibt es keine Duplikationen von Basenpaaren, die man bei einem zugrundeliegenden Transpositionereignis finden müßte. Der Integrationsvorgang bei einer Transposition wird durch einen versetzten Schnitt in der Ziel-DNA eingeleitet, so daß einzelsträngige vorstehende Enden entstehen. Folglich ergibt sich nach der Insertion eine Duplikation des durch den Schnitt entstandenen einzelsträngigen Bereiches (Cohen und Shapiro 1980).

Auch gibt es kein Anzeichen dafür, daß reverse Transkription von Plasmid-Transkripten in DNA für die homologe Region verantwortlich wäre. In der hmw mtDNA befindet sich ein vollständiges rechtes Ende, während die Transkription erst innerhalb des TIR startet (Düvell 1988).

Hinweise auf eine Beteiligung von RNA-Transkripten und reverser Transkription gibt es bei der Integration von den mitochondrialen zirkulären Mauriceville und Varkud Plasmiden in die hmw mtDNA von Neurospora-Mutanten. Dort finden über komplexe, nur teilweise aufgeklärte Mechanismen Änderungen der Plasmide, Integration der Plasmide in die hmw mtDNA und Veränderungen der hmw mtDNA statt, die zu Wachstumsbehinderungen oder Zelltod führen (Akins et al. 1986).

Da die Nähe des lrRNA-Genes für die pCIK1-homologe Region in verschiedenen Claviceps-Stämmen typisch zu sein scheint, ist es interessant, daß ein häufiger Integrationsort für ein ursprünglich als Kernplasmid bezeichnetes mt Plasmid - das Kalilo-Plasmid von N. intermedia - das lrRNA-Gen ist. Das Kalilo-Plasmid ist vollständig integriert und von großen mitochondrialen Sequenz-Wiederholungen flankiert, die vermutlich durch sekundäre Rekombination zwischen hmw mtDNA-Molekülen mit einem integriertem Plasmid entstehen (Bertrand 1986).

Eine neuere Hypothese, die auf der Untersuchung mehrerer Integrationsorte beruht, geht von einem replikativen Einbau des Kalilo-Plasmides in die hmw mtDNA aus. Sie beruht auf folgenden Befunden: 5 bp-Homologien

zwischen den Plasmid-Enden und der hmw mtDNA, Verlust der endständigen Basen des Plasmides, die außerhalb der 5 bp-Homologie liegen und Entstehen von großen inversen Sequenzwiederholungen in der hmw mtDNA (Bertrand pers. Mittell.).

Fast alle untersuchten Integrationsorte des Kalilo-Plasmides liegen innerhalb von Genen, was bei Kalilo-Stämmen von N. intermedia zur Seneszenz führt (Bertrand 1986). Das Ergebnis der Rekombination weicht deutlich von dem bei Claviceps ab. So wurde versucht, ein Vergleichssystem zu finden, das eventuell größere Parallelen zur Integration eines Plasmid-Endes mitsamt TIR in die hmw mtDNA des Claviceps-Stammes W3 aufweist.

Eine Parallele findet sich in einem anderen biologischem System als dem eines Pilzes. Die strukturell mit den Claviceps-Plasmiden verwandten Adenoviren rekombinieren mit der DNA ihres Wirtes (Mammalia). Neben integrierten intakten Virusgenomen findet man auch Teile des Virus-Genoms integriert. Es gibt keinen Hinweis auf Transposition. Die Rekombinationsstelle der Viren scheint sich an oder in der Nähe der Enden der viralen DNA (TIR) zu befinden. Selten findet man Deletionen von endständigen Basen des TIR. Zwischen den Sequenzen der Adenoviren und der Wirts-DNA gibt es keine ausgeprägten Homologien. Eine transkriptionelle Aktivität wurde an allen daraufhin untersuchten Präinsertions-Stellen - Stellen der Wirts-DNA, in denen man in infizierten Zellen Integration gefunden hat - festgestellt. Sie könnte bedeuten, daß die Transkription einer Region eventuell eine Möglichkeit für die Invasion der Adenovirus-DNA bietet (Doerfler et al. 1983, Schulz et al. 1987).

Ebenfalls eine Involvierung von TIRs findet man bei der Rekombination der Plasmide S1 und S2 (Z. mays) mit ihrer hmw mtDNA. Das mt Genom enthält 186 bp große Wiederholungen, die homolog zum Anfang der 208 bp großen TIRs der S-Plasmide sind. Rekombination zwischen diesen TIR-homologen Sequenzen in der hmw mtDNA und den Plasmiden S1 und S2 führt zu Linearisierung der hmw mtDNA und in Folge auch zu integrierten Plasmiden. Unter bestimmten Umständen kann auch der Verlust von freien Plasmiden und die Rezirkularisierung der hmw mtDNA beobachtet werden. Auf die Art der Veränderungen hat auch der Kernhintergrund des Cytoplasmas vom Mais, in dem die Plasmide S1 und S2 vorkommen, Einfluß. Je nach Kernhintergrund findet man entweder Rezirkularisierung der hmw mtDNA, freie Plasmide und intakte integrierte S1- und S2-Plasmide oder Rezirkularisierung der hmw mtDNA, völliger Verlust von freien Plasmiden, intakte integrierte S1-Plasmide und integrierte S2-Plasmide, denen ein Teil des rechten TIR fehlt (Isaac et al. 1985, Schardl et al. 1985, Escote-Carlson et al. 1988). Soweit untersucht, wurden keine signifikanten Duplikationen an den Grenzen zwischen hmw mtDNA und Plasmid-DNA gefunden, so daß Transposition vermutlich ausgeschlossen werden kann. Den Bereichen der hmw mtDNA, die die Plasmidsequenzen flankieren, scheint eine 34 bp große Sequenz gemeinsam zu sein. Sie enthält eine Sequenz, die dem vermutlichen mitochondrialen Promotor von S. cerevisiae ähnelt (Braun et al. 1986). Diese flankierende Sequenz stellt vermutlich eine Präinsertions-Stelle für den ersten

Kontakt der hmw mtDNA mit einem Mais-Plasmid dar, da die 186 bp großen TIR-homologen Regionen der hmw mtDNA einen Ursprung besitzen müssen.

Vergleicht man die Befunde der drei hier beschriebenen Systeme, fallen als erstes die Unterschiede auf.

- 1) Im Adenovirus-System scheint eine Integration von intakten Genomen zu überwiegen. Die Funde von integrierten Teilstücken beruhen entweder auf Deletionen von intakt integrierten Virus-Genomen oder auf einem vorzeitigen Abbruch der wahrscheinlich vom Ende des Virus her erfolgenden Rekombination mit der Wirts-DNA. Die zweite Erklärungsmöglichkeit steht mit einem hypothetischen Modell der Adenovirus-Integration in Einklang. Es schlägt vor, daß der Rekombinationsprozeß mit der Invasion eines einzelsträngigen TIR-Endes in die doppelsträngige Wirts-DNA eingeleitet wird.
- 2) Die Häufigkeit, mit der S-Plasmide (Z. mays) über ihren TIR mit TIR-homologen Regionen in der hmw mtDNA homolog rekombinieren, lenkt von der Frage ab, wie die TIR-homologen Sequenzen in der hmw mtDNA entstanden sind. Ihre Entstehungsgeschichte hat vermutlich Ähnlichkeit mit der Integration der Adenoviren bzw. der Claviceps-Plasmide.
- 3) Im Claviceps-System gibt es anscheinend keine Integration von intakten Plasmiden.

Eventuell lassen sich diese Unterschiede darauf zurückführen, daß es sich hier um verschiedene Systeme - Tier, Pflanze, Pilz - handelt. Immerhin kann man Übereinstimmungen in der Art der Rekombination finden :

- 1) Die Ereignisse sind wahrscheinlich nicht auf Transposition zurückzuführen.
- 2) Es gibt keinen Hinweis auf größere Homologien zwischen den beiden rekombinierenden DNAs, so daß homologe Rekombination wahrscheinlich ausscheidet. Bei den Adenoviren scheint Transkription der Präinsertions-Stellen Voraussetzung zu sein. Folglich mag Transkription oder auch Replikation den Zugang zur höhermolekularen DNA erleichtern.
- 3) An der Rekombination sind TIRs beteiligt, da man sie als kleinsten gemeinsamen Nenner der homologen Bereiche in den verschiedenen höhermolekularen DNAs findet. Es könnte sein, daß das Modell für die Adenovirus-Integration, das einen Einzelstrangangriff ausgehend vom TIR vorsieht, allgemeine Bedeutung für die Rekombination dieser gleich strukturierten, aber aus verschiedenen Systemen stammenden DNA-Elementen besitzt. Einzelsträngige TIR-Enden könnten z.B. bei der Replikation entstehen, deren Modus vermutlich für die drei DNA-Elemente ähnlich ist.

Da sich die Schlüsse auf Seiten von Claviceps nur auf eine bis ins Detail charakterisierte Homologie zwischen Plasmid und hmw mtDNA stützen und es sich dabei um eine Homologie eines Plasmides (pClK1 - Stamm K) zu der hmw mtDNA eines anderen Stammes (W3) handelt, ist es notwendig, andere Rekombinationsereignisse von Claviceps-Plasmide zu untersuchen. Dabei wäre es interessant zu überprüfen, ob es tatsächlich keine vollständigen Integrate von Claviceps-Plasmiden gibt.

Eventuell beobachtet man sie nicht, da eine vollständige Integration Letalität zur Folge hat.

5.6 Plasmid-Definition

Als Plasmid bezeichnet man "ein autonom replizierendes genetisches Element, das zusätzlich zum normalen Genom vorkommt". Im Unterschied zu Viren besitzt es keine Proteinhülle und kommt extrazellulär nicht vor. Mit dieser Definition wird die gesamte Bandbreite der pro- und eukaryontischen Plasmide – lineare und zirkuläre, DNA- und RNA-Plasmide – erfaßt.

In Arbeiten, die lineare Plasmide beschreiben, fällt in Hinblick auf die Plasmiddefinition Folgendes auf:

- 1) Als Hinweis auf eine autonome Replikation des gefundenen genetischen Elementes wird zumeist die Tatsache gewertet, daß das Element keine Homologie zur DNA des normalen Genoms besitzt (z.B. pSCL in St. clavuligerus; Keen et al. 1988, pEM und pMPJ in A. bitorquis; Mohan et al. 1984, pFOXC1 und pFOXC2 in F. oxysporum f.sp. conglutinans; Kistler und Leong 1986).
- 2) Anscheinend wird die Lebensnotwendigkeit des Elementes danach beurteilt, ob man es in allen untersuchten Isolaten, Rassen, Stämmen etc. finden kann. Ein Vorkommen in nicht jedem Fall spricht dafür, daß das Element nicht zum normalen Genom gehört. Selten gelang die Korrelation einer Funktion mit dem gefundenen Element. Die gefundenen Funktionen scheinen nicht lebensnotwendig zu sein (Produktion von Killertoxinen durch die Plasmide pGK11 und pGK12 in K. lactis; Gunge 1983, Produktion von Antibiotika bei den Plasmiden pSLA1 und pSLA2 in St. rochei; Hirochika et al. 1984, Induktion der Seneszenz durch das Kalilo-Plasmid von N. intermedia; Bertrand et al. 1985). Beim 2,3 kb Plasmid (Z. mays) stellt sich die Frage, ob es im strikten Sinne noch als Plasmid bezeichnet werden darf. Das 2,3 kb Plasmid oder ein 150 bp kleineres Derivat wurde in allen bislang untersuchten Maispflanzen gefunden (Bedinger et al. 1986) und trägt offenbar das einzige tRNA^{Trp}-Gen in den Mitochondrien (Marechal et al. 1987).
- 3) Da die Erfüllung der ersten beiden Punkte nicht ausschließt, daß es sich bei dem gefundenen Element um einen Virus handelt, sprechen vorsichtige Autoren von "plasmid-like" Elementen (z.B. Mohan et al. 1984). Andere versuchten Viruspartikel nachzuweisen. Ohne Erfolg wurde in folgenden Fällen nach Viruspartikeln gesucht: K. lactis (Plasmide pGK11 und pGK12) Sor und Fukuhara 1985, S-Cytoplasma des Mais (DNA- und RNA-Plasmide) Finnegan und Brown 1986, E. solani f. sp. cucurbitae (Plasmide pFSC1 und pFSC2) Samac und Leong 1988). Beim Kalilo-Plasmid konnte kein infektiöser Faktor aus den Kalilo-Stämmen von N. intermedia isoliert werden (Bertrand 1986).

Insgesamt besteht eine gewisse Tendenz, lineare niedermolekulare DNA-Moleküle als Plasmid zu bezeichnen.

Da pClk2 und pClk3 vermutlich Produkte von pClk1 sind und keine autonomen Elemente darstellen, reduziert sich die Frage im Falle des Claviceps-Stammes K darauf, ob pClk1 in der Tat ein Plasmid ist oder nicht:

- 1) pClk1 scheint autonom zu replizieren. Darauf hin deutet, daß es in erheblich höherer Kopienzahl als die hmw mtDNA in den Mitochondrien vorkommt, daß es keine Homologie zu seiner eigenen hmw mtDNA besitzt, daß sein TIR in Bezug auf die Replikation Ähnlichkeit zu dem der Adenoviren zeigt und daß es vermutlich für eine DNA-Polymerase codiert.
- 2) "Curing"-Experimente zeigen, daß pClk1 in axenischer Kultur für den Stamm K nicht lebensnotwendig ist (Düvell et al. 1988).
- 3) Im Stamm K wurde bis dato nicht nach Viruspartikeln gesucht. Ein Nachweis von Viruspartikeln würde allerdings nicht unbedingt bedeuten, daß pClk1 in den Virus-Partikeln vorkommt. RNA-Viren sind in Pilzen so weit verbreitet (Deacon 1984), daß ein gleichzeitiges Auftreten eines DNA-Plasmides und eines RNA-Virus nicht auszuschließen ist. Die Sequenzanalyse von pClk1 gibt keine Hinweise darauf, daß einer oder mehrere der URFs von pClk1 für ein Hüllprotein codieren könnte. Es wäre jedoch sicherlich interessant zu überprüfen, ob eventuell mit pClk1 korrelierte Viruspartikel auftreten oder nicht.

Unter Berücksichtigung der bekannten Daten für pClk1 scheint die Bezeichnung "Plasmid" für pClk1 angemessen zu sein.

5.7 Mögliche Herkunft und Funktion von pClk1

Das als Plasmid bezeichnete genetische Element pClk1 des C. purpurea-Stammes K besitzt vermutlich einen ähnlichen Replikationsmodus wie die Adenoviren und die Bacillus-Phagen (s. Kap.5.2). Ob diese Tatsache allein auf einen viralen Ursprung von pClk1 hinweist, ist unklar. Es ist durchaus denkbar, daß unabhängig voneinander der gleiche Replikationsmodus mehrmals in der Entwicklungsgeschichte entstand: Der Gebrauch eines Protein-Primers hilft, ein lineares Molekül mit abschließend in 5'-3'-Richtung polymerisierenden Enzymen vollständig zu synthetisieren.

Für die Lösung dieses Replikations-Problems linearer DNA-Elemente findet man neben dem Gebrauch eines Protein-Primers bei Adenoviren und verschiedenen Phagen noch viele andere Lösungen. Das Genom des Bakteriophagen T7 wird zunächst nur unvollständig repliziert, doch bilden die Moleküle auf Grund von Sequenzwiederholungen an den Enden Konkatemere, die eine Vervollständigung der Replikation ermöglichen. Herpesviren rezirkularisieren vor der Replikation und produzieren Konkatemere, die bei der Virus-Reifung zu Virion-DNA-Einheiten prozessiert werden. Die Pockenviren umgehen das Problem durch die Struktur ihrer Enden, die geschlossene "hairpin loops" darstellen. Bei den Chromosomen von Eukaryonten bestehen die Enden aus vielen, kurzen, wiederholten Sequenzeinheiten, deren Teilverlust nach der Replikation durch Anfügen neuer Einheiten durch eine sogenannte Telomerase ausgeglichen wird (Watson et al. 1987, Kornberg 1982, Kornberg 1980).

Auch wäre es spekulativ zu vermuten, daß das Vorkommen von plasmid-homologen Regionen in der hmw mtDNA von Claviceps, deren Ausdehnung anscheinend nie einem ganzen Plasmid entspricht (s. S.4), auf eine rudimentäre Fähigkeit der Plasmide zu einer vollständigen Integration - ähnlich dem Verhalten lysogener Viren - zurückzuführen ist. Die Charakterisierung des pClK1-homologen Bereiches in der hmw mtDNA des Stammes W3 läßt nur einen Schluß auf die Natur des zugrundeliegenden Ereignisses zu und keinen auf die Herkunft des Plasmides.

In der Summe jedoch weisen folgende Punkte auf einen viralen Ursprung von pClK1 und anderen Claviceps-Plasmiden hin:

- ein vermutlich zu dem Replikationsmodus linearer Viren analoger Replikationsmodus von pClK1 (s. Kap.5.2)
- die Codierungskapazität einer DNA- und RNA-Polymerase des Plasmides pClK1 und die damit vermutlich verbundene relativ große Autonomie des Elementes (s. Kap.5.3.1 und 5.3.2)
- die Homologien der DNA- und RNA-Polymerase von pClK1 insbesondere auch zu viralen Polymerasen (s. Kap.5.3.1 und 5.3.2)
- die weite Verbreitung von offenbar miteinander verwandten Claviceps-Plasmiden (Düvell et al. 1988).

Die Parallelen zu anderen Plasmidsystemen, insbesondere S1 und S2 (Z. mays), bestätigen oder lassen einen viralen Ursprung auch dieser Plasmide vermuten.

Ein viraler Ursprung der Claviceps-Plasmide läßt sich nur schwer zeitlich festlegen. Eine Gültigkeit der Endosymbiontentheorie vorausgesetzt, kann die "Invasion" der künftigen Plasmide vor oder nach dem Entstehen der Mitochondrien datiert werden. Beide Möglichkeiten sind denkbar, da das "Dogma", daß Nukleinsäuren nicht in Mitochondrien importiert werden können, nicht mehr aufrechtzuhalten ist (Marechal-Drouard et al. 1988, Suyama 1986, Wong und Clayton 1986, Chang und Clayton 1987).

Bei Phaseolus vulgaris und bei dem Ciliaten Tetrahymena wird ein Teil der mitochondrialen tRNAs vom Kern codiert und in die Mitochondrien importiert. Die Primase in den menschlichen Mitochondrien scheint eine extramitochondriale RNA-Komponente zu besitzen. Auch gibt es dort offenbar eine Endoribonuklease, die eine kerncodierte RNA für ihre Aktivität benötigt.

Zum jetzigen Zeitpunkt muß man das Plasmid pClK1 als ein genetisches Element viralen Ursprunges ansehen. Bislang konnte keine mit diesem Element korrelierte Funktion nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Sequenzanalyse zeigt, daß pClK1 für sechs Proteine codieren könnte, da es sechs URFs gibt (s. Kap.5.3.1 bis 5.3.4). URF1 besitzt Homologie zu DNA-Polymerasen und URF2 zu RNA-Polymerasen. Für die kleinen URFs konnte keine Homologie zu bekannten Proteinen gefunden werden. Aufgrund dieser von der DNA-Sequenz des Plasmides abgeleiteten Codierungskapazität kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß pClK1 eine Funktion für den Mutterkornpilz besitzt. Zwar ist das "Curing" von pClK1 in axenischen Kulturen möglich und es treten dabei keine phänotypischen Unterschiede auf, doch könnte

das Plasmid eine Funktion besitzen, die nur in einem bestimmten "natürlichen" Lebensabschnitt des Pilzes und nicht im Labor sichtbar wird. So zeigen Untersuchungen des Ruhestadiums (Sklerotien), daß auch dort eine hohe Plasmid-Konzentration nachgewiesen werden kann (Düvell et al. 1988).

Feldversuche mit dem von pClK1 "geheiltem" Claviceps-Stamm K deuten auf eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese. Die geheilten Stämme sind anscheinend nicht mehr zur normalen Sklerotienbildung - dem Überwinterungsstadium des Mutterkornpilzes - fähig. Da das "Curing" mit Ethidiumbromid - einem mutagenem Agens - durchgeführt wurde, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es neben dem Verlust von pClK1 auch zu Veränderungen im Kern- und/oder Mitochondriengenom gekommen ist. (Tudzynski pers. Mitteil.)

Bei verschiedenen phytopathogenen Pilzen wurden lineare, zum Teil mitochondrial lokalisierte Plasmide gefunden, die eventuell mit der Pathogenität ihrer Träger in Verbindung gebracht werden können (Hashiba et al. 1984, Kistler und Leong 1986, Samac und Leong 1988).

Pathogene Isolate von R. solani enthalten kein Plasmid. Dagegen zeigt der Pilz F. solani f.sp. cucurbitae nach einem Plasmid-"Curing" reduzierte Pathogenität. Die verschiedenen Plasmide von F. oxysporum f.sp. conglutinans scheinen rassen- bzw. wirtsspezifisch zu sein. Für die Fusarium-Plasmide ist eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen.

Urteilt man nach dem Plasmid-"Curing" der axenischen Kultur von Claviceps, das keinen Einfluß auf den Phänotyp des Pilzes hat, besitzt pClK1 keine für den Stoffwechsel von Claviceps wichtige Funktion: pClK1 scheint den Charakter einer "selfish DNA" zu besitzen, da pClK1 vermutlich für seine eigene Vermehrung sorgt und dabei im Wirtsorganismus selber nur minimalen Schaden anrichtet. Eine alleinige Untersuchung der axenischen Kultur läßt letztendlich allerdings offen, ob das Plasmid pClK1 eine Funktion in der Pathogenese und/oder dem sexuellen Zyklus von Claviceps besitzt.

Innerhalb der Claviceps-Plasmide nimmt das Plasmid pClK1 eine Sonderstellung ein:

- 1) pClK1 besitzt keine Homologe zur hmw mtDNA seines eigenen Stammes.
- 2) Die neben pClK1 existierenden Plasmide pClK2 und pClK3 sind allem Anschein nach keine autonomen Plasmide, sondern entstehen aus pClK1.
- 3) Während der mehrjährigen Laborkultur von pClK1 kam es nie zu einem spontanen Verlust von pClK1, während bei anderen Stämmen ein teilweiser oder völliger Verlust von Plasmiden beobachtet wurde.

Doch da das Plasmid pClK1 (Stamm K) in abgestufter Grad Homologie zu Claviceps-Plasmiden anderer Stämme zeigt, können die Besonderheiten von pClK1 seinen Wert für eine grundlegende Charakterisierung der Plasmide von C. purpurea nicht mindern. Ein besonderer Aspekt ist die Rekombination der Claviceps-Plasmide mit der hmw mtDNA, die weder auf einer Transposition noch auf einer reversen Transkription noch auf homologer Rekombination zu beruhen scheint.

6. Zusammenfassung

Die Sequenz des mitochondrialen Plasmides pClK1 (Stamm K) von *Claviceps purpurea* wurde als Repräsentant eines *Claviceps*-Plasmides bzw. eines linearen Plasmides von filamentösen Pilzen analysiert. Sie umfaßt 6752 bp.

pClK1 besitzt einen perfekten TIR von 327 bp. Er enthält eine 10 bp-Sequenz mit Homologie zu einer konservierten 10 bp-Sequenz von Adenoviren, die bei menschlichen Adenoviren unbedingt für die Initiation der Replikation erforderlich ist. Der Replikationsmodus von pClK1 könnte dem der Adenoviren gleichen.

Es gibt Strukturbesonderheiten in dem Bereich des Plasmides pClK1, in dem die beiden zu pClK1 kolinearen Elemente pClK2 und pClK3 aufeinanderstoßen. Damit ist die Theorie, daß pClK2 und pClK3 durch endonukleolytische Spaltung aus dem Plasmid pClK1 entstehen, bedingt unterstützbar. pClK2 und pClK3 sind offenbar keine autonomen Plasmide.

pClK1 besitzt 6 URFs - zwei große (URF1 und URF2) und vier kleine (URF3 bis URF6). Für die vier kleinen URFs wurden keine Homologien zu bekannten Proteinen gefunden. URF1 zeigt Homologie zu den DNA-Polymerasen der Familie B, zu denen auch viele virale DNA-Polymerasen gehören. URF2 zeigt Homologie zu den einfach gebauten RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 und SP6 sowie zu der mitochondrialen RNA-Polymerase von *Saccharomyces cerevisiae*.

Als Beispiel für die Homologie von *Claviceps*-Plasmiden mit der hmw mtDNA wurde die Homologie von pClK1 (Stamm K) mit der hmw mtDNA des Stammes W3 analysiert. Diese Homologie beruht offenbar auf Rekombination: Das rechte Ende von pClK1 zeigt eine 95%ige Homologie zur hmw mtDNA von W3. Dabei ist URF5 von pClK1 als URFa in der hmw mtDNA von W3 konserviert. Es handelt sich vermutlich um nichthomologe Rekombination. An ihr ist wahrscheinlich der TIR des Plasmides beteiligt.

Das Plasmid pClK1 scheint viralen Ursprunges zu sein. Seine Codierungskapazität deutet nicht auf eine Lebensnotwendigkeit des Plasmides hin, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, daß das Plasmid pClK1 nur in einem ganz bestimmten Lebensabschnitt für den Pilz wichtig ist.

Literaturverzeichnis

- Akins RA, Kelley RL, Lambowitz AM (1986) Mitochondrial plasmids of Neurospora: integration into mitochondrial DNA and evidence for reverse transcription in mitochondria. *Cell* 47:505-516
- Aleström P, Akusjarvi G, Petterson M, Petterson U (1982) DNA sequence analysis of the region encoding the terminal protein and the hypothetical N-gene product of adenovirus type 2. *J Biol Chem* 257:13492-13498
- Alton NK, Vapnek D (1979) Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* 282:864-869
- Aota S, Gojobori T, Ishibashi F, Maneyama T, Ikemura T (1988) Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nuc Acids Res* 16 Supplement: r315-r402
- Armaleo D (1987) Structure and evolution of prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases: a model. *J Theor Biol* 127:301-314
- Baer R, Bankier AT, Biggin AD, Deininger PL, Farrel PJ, Gilson FJ, Hatfell G, Hudson GS, Satchwell SC, Seguin C, Tuffnell PS, Barrel BG (1984) DNA sequence and expressin of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310:207-211
- Bailey JN, Klement JR, McAllister WT (1983) Relationship between promotor structure and template specificity exhibited by the bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2814-2818
- Bedinger P, de Hostos EL, Leon P, Walbot V (1986) Cloning and characterization of a linear 2,3 kb mitochondrial plasmid of maize. *Mol Gen Genet* 205:206-212
- Bernad A, Zaballos A, Salas M, Blanco L (1987) Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J* 6:4219-4225
- Bernardi G (1982) The origins of replication of the mitochondrial genome of yeast. *TIBS* 7:404-408
- Bertrand H (1986) The kalilo senescence factor of Neurospora intermedia: A mitochondrial IS-element derived from a nuclear plasmid. In: *Extrachromosomal elements in lower eukaryotes*. Basic Life Sciences, Vol. 40. Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz AM, Gunsalus JC, Hollaender A, eds. Plenum Press, New York, London. 93-103
- Bertrand H, Chan BSS, Griffith AJF (1985) Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA caused senescence in Neurospora intermedia. *Cell* 41:877-884
- Bertrand H, Griffith AJF, Court DA, Cheng CK (1986) An extrachromosomal plasmid is the ethiological precursor of kalDNA insertion sequences in the mitochondrial chromosome of senescent Neurospora. *Cell* 47:829-837
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res* 7:1513-1523
- Blanco L, Salas M (1985) Characterization of 3'5'exonuclease activity in phage Phi29 encoded DNA polymerase. *Nuc Acids Res* 13:1239-1249

- Braun CJ, Sisco PH, Sederoff RR, Levings III CS (1986) Characterization of inverted repeats from plasmid-like DNAs and the maize mitochondrial genome. *Curr Genet* 10:625-630
- Brown TA (1987) The mitochondrial genomes of filamentous fungi. In: Gene structure in eukaryotic microbes. Kinghorn JR, ed. IRL Press, Oxford Washington DC. 141-162
- Brown TA, Waring RB, Scazzocchio C, Davies RW (1985) The Aspergillus nidulans mitochondrial genome. *Curr Genet* 9:113-117
- Brunier D, Michel B, Ehrlich SD (1988) Copy choice illegitimate DNA recombination. *Cell* 52:883-892
- Bunns HH, Stenzler L, Tomley FM, Campbell J, Bournsnel EG (1987) Identification by a random sequencing strategy of the fowlpoxvirus DNA polymerase gene, its nucleotide sequence and comparison with other viral DNA polymerases. *Nuc Acids Res* 16:6563-6573
- Campbell JL (1986) Eukaryotic DNA replication. *Ann Rev Biochem* 55:733-771
- Cavalier-Smith T (1987) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326:332-333
- Cech TR (1986) The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* 44:207-210
- Chang DD, Clayton DA (1987) A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* 235:1178-1184
- Chen EJ, Seeburg PH (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4:165-170
- Chou BV, Fasman GD (1982) The secondary structure of proteins from their amino-acid sequence. *Adv Enzymol* 47:45-148
- Clark-Walker CD, McArthur CR, Scriprakash KS (1985) Localisation of transcriptional control signals and transfer RNA sequences in Torulopsis globrata mitochondrial DNA. *EMBO J* 4:465-473
- Cohen SN, Shapiro JA (1988) Transposable genetic elements. *Scientific American* 242:36-45
- Craigien WJ, Caskey CT (1987) Translational frameshifting: Where will it stop?. *Cell* 50:1-2
- Davison AJ, Scott JE (1986) The complete DNA sequence of Varicella-Zoster virus. *J Gen Virol* 67:1759-1816
- Deacon JW (1984) Introduction to modern mycology. Basic microbiology, Vol.7, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 146-148.
- Dekker BMM, Ormondt H van (1984) The nucleotide sequence of fragment HindII-C of human adenovirus type 5 DNA (map positions 17.1-31.7) *Gene* 27:115-120
- Doerfler W (1988) Integration und Expressionskontrolle viraler Gene. *BioEngineering* 1:51-56

- Doerfler W, Gahlmann R, Stabel S, Deuring R, Lichtenberg U, Schulz M, Eick D, Leisten R (1983) On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs: the structure of junction sites. *Curr Top Microbiol Immunol* 109: 193-227
- Düvell A (1988) Struktur und Funktion linearer Plasmide bei dem phytopathogenem Ascomyceten Claviceps purpurea. Dissertation, Bochum.
- Düvell A, Hessberg-Stutzke H, Oeser B, Rogmann-Backwinkel P, Tudzynski P (1988) Structural and functional analysis of mitochondrial plasmids in Claviceps purpurea. *Mol Gen Genet* 214: 128-134
- Dyson NJ, Brown TA, Waring RB, Davies RW (1988) The mitochondrial ribosomal RNA molecules of Aspergillus nidulans. *Gene* (Im Druck)
- Earl PL, Jones EV, Moss B (1986) Homology between DNA polymerases of poxviruses, herpesviruses, and adenoviruses: nucleotide sequence of the vaccinia virus DNA polymerase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3659-3663
- Ebringer L, Krajcovic J (1986) Are chloroplasts and mitochondria the remnants of prokaryotic endosymbionts?. *Folia Microbiol* 31:228-254
- Ebringer L, Krajcovic J (1987) Prokaryotic character of chloroplasts and mitochondria - the present knowledge. *Folia Microbiol* 32:244-280
- Eisen H (1988) RNA editing: Who's on first?. *Cell* 53:331-332
- Escote LJ, Gabay-Laughnan SJ, Gabay-Laughnan JR (1985) Cytoplasmic reversion to fertility in cms-S maize need not involve loss of linear mitochondrial plasmids. *Plasmid* 14:264-267
- Escote-Carlson LJ, Gabay-Laughnan SJ, Gabay-Laughnan JR (1988) Reorganisation of mitochondrial genomes of cytoplasmic revertants in cms-S inbred line WF9 in maize. *Theor Appl Genet* 75:659-667
- Esser K, Tudzynski P (1978) Genetics of the ergot fungus Claviceps purpurea. I. Proof of a monoecious life cycle and segregation patterns for mycelial morphology and alkaloid production. *Theoret Appl Genet* 53:145-149
- Esser K, Kück U, Lang-Hinrichs C, Lemke P, Osiewacz HD, Stahl U, Tudzynski P (1986) Plasmids of eukaryotes - Fundamentals and applications. Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo
- Evans RM, Hollenberg SM (1988) Zinc fingers: gilt by association. *Cell* 52:1-3
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13
- Finnegan DJ (1985) Transposable elements in eukaryotes. *Int Rev Cytol* 93:281-326
- Finnegan PM, Brown GG (1986) Autonomously replicating RNA in mitochondria of maize plants with S-type cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5175-5179
- Fisher RP, Topper JN, Clayton DA (1987) Promotor selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation independent upstream regulatory elements. *Cell* 50:247-258
- Fox TD (1987) Natural variation in the genetic code. *Ann Rev Genet* 21:67-91

- Francou FX, Randscholt N, Decaris B, Gregoire A (1987) Presence of several plasmids in the fungus Ascobolus immersus, and homologies with the linear plasmid pA1. J Gen Microbiol 133:311-316
- Fujimura H, Yamada T, Hishinuma F, Gunge N (1988) DNA replication in vivo of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Let 49:441-444
- Garber RC, Lin JJ, Yoder OC (1986) Mitochondrial plasmids in Cochliobolus heterostrophus. In: Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. Basic Life Sciences, Vol. 40. Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz AM, Gunsalus JC, Hollaender A, eds. Plenum Press, New York, London. 105-118
- Garcia E, Gomez A, Ronda C, Escarmis C, Lopez R (1983) Pneumococcal bacteriophage Cp-1 contains a protein bound to the 5' termini of its DNA. Virology 128: 92-104
- Garcia P, Hermoso JM, Garcia JA, Garcia E, Lopez R, Salas M (1986) Formation of a covalent complex between the terminal protein of pneumococcal bacteriophage Cp-1 and 5'-dAMP. J Virol 58:31-35
- Garmendia C, Salas M, Hermoso JM (1988) Site-directed mutagenesis in the DNA linking site of bacteriophage Phi29 terminal protein: isolation and characterization of a Ser232 - Thr mutant. Nuc Acids Res 16:5727-5735
- Giasson L, Lalonde M (1987) Analysis of a linear plasmid isolated from the pathogenic fungus Ceratocystis fimbriata Ell. & Halst.. Curr Genet 11:331-334
- Gibbs JS, Chiou HC, Hall JD, Mount DW, Retondo MJ, Weller SR, Coen DM (1985) Sequence and mapping analyses of the herpes simplex virus DNA polymerase gene predict a C-terminal substrate binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7969-7973
- Gray MW (1982) Mitochondrial genome diversity and the evolution of mitochondrial DNA. Cand J Biochem 60:157-171
- Gray MW (1983) The bacterial ancestry of plastids and mitochondria. Bioscience 33:693-699
- Greenleaf AL, Kelley JL, Lehman IR (1986) Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. Proc Natl Acad Sci USA 83:3391-3394
- Grunstein M, Hogness DS (1975) Colony hybridisation: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc Natl Acad Sci USA 72:3961-3965
- Guggenheimer RA, Stillman BW, Nagata K, Tamanoi F, Hurwitz J (1984) DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA. Proc Natl Acad Sci USA 81:3069-3073
- Guitierrez J, Garmendia C, Salas M (1988) Characterization of the origin of replication of bacteriophage Phi29 DNA. Nuc Acids Res 16:5895-5904
- Gunge N (1983) Yeast DNA plasmids. Ann Rev Microbiol 37:253-276
- Gunge N (1986) Some structural aspects of linear DNA plasmids in yeast. In: Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. Basic Life Sciences, Vol.40. Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz AM, Gunsalus JC, Hollaender A, eds. Plenum Press, New York London. 449-461

- Hall JD (1988) Modelling functional sites in DNA polymerases. *TIG* 4:42-46
- Harris MPG, Hay RT (1988) DNA sequences required for the initiation of adenovirus type 4 DNA replication in vitro. *J Mol Biol* 201:57-67
- Hashiba T, Homma Y, Hyakumachi M, Matsuda I (1984) Isolation of a DNA plasmid in the fungus Rhizoctonia solani. *J Gen Microbiol* 130:2067-2070
- Henikoff S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28:351-359
- Hermoso JM, Mendez E, Soriano F, Salas M (1985) Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of phage Phi29. *Nuc Acids Res* 13:7715-7728
- Hirochika H, Nakamura K, Sakaguchi K (1984) A linear DNA plasmid from Streptomyces rochei with an inverted terminal repetition of 614 base pairs. *EMBO J* 3:761-766
- Hishinuma F, Nakamura K, Hirai K, Nishizawa R, Gunge N, Maeda T (1984) Cloning and nucleotide sequences of the linear DNA killer plasmids from yeast. *Nuc Acids Res* 12:7581-7597
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114:193-197
- Honeyman AL, Currier TC (1986) Isolation and characterization of linear DNA elements from the mitochondria of Gaeumannomyces graminis. *Appl Environ Microbiol* 52:924-929
- Howley PM, Israel MA, Law M-F, Martin MA (1979) A rapid method for detection and mapping homology between heterologous DNAs. *J Biol Chem* 254:4876-4883
- Hsieh J-C, Jung G, Leavitt MC, Ito J (1987) Primary structure of the DNA terminal protein of bacteriophage PRD1. *Nuc Acids Res* 15:8999-9009
- Hudson GS, Holton TA, Whitfield PR, Bottomley W (1988) Spinach chloroplast proBC genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J Mol Biol* 200:639-654
- Isaac PG, Jones VP, Leaver CJ (1985) The maize cytochrome c oxidase subunit I gene: sequence, expression and rearrangement in cytoplasmic male sterile plants. *EMBO J* 4:1617-1623
- Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984) Improved technique utilizing notfat dry milk for analysis of proteins and Nuc acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Technol* 1:3-8
- Jung G, Leavitt MC, Hsieh J-C, Ito J (1987a) Bacteriophage PRD1 DNA polymerase: Evolution of DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8287-8291
- Jung G, Leavitt MC, Ito J (1987b) Yeast killer plasmid pGKL1 encodes a DNA polymerase belonging to the family B DNA polymerases. *Nuc Acids Res* 15:9088
- Keen CI, Mendelovitz S, Cohen G, Aharonowitz Y, Roy KI (1988) Isolation and characterization of a linear DNA plasmid from Streptomyces clavuligerus. *Mol Gen Genet* 212:172-176

- Kemble RJ, Thompson RD (1982) S1 and S2, the linear mitochondrial DNAs present in a male sterile line of maize, possess terminally attached protein. *Nuc Acids Res* 10:8181-8190
- Kiguchi Y, Hirai K, Hishinuma F (1984) The yeast linear DNA killer plasmids, pGK11 and pGK12, possess terminally attached proteins. *Nuc Acids Res* 12:5685-5692
- Kingsman AJ, Kingsman SM (1988) Ty: A retroelement moving forward. *Cell* 53:333-335
- Kistler HC, Leong SA (1986) Linear plasmid-like DNAs in the plant pathogenic fungus Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans. *J Bacteriol* 167:587-593
- Kitada K, Hishinuma F (1987) A new linear DNA plasmid isolated from the yeast Saccharomyces kluyveri. *Mol Gen Genet* 206:377-381
- Kleckner N (1981) Transposable elements in prokaryotes. *Ann Rev Genet* 15:341-404
- Knopf CW (1986) Nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of herpes simplex virus type 1 strain Angelotti. *Nuc Acids Res* 14:8225-8226
- Kornberg A 1980. DNA replication, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Kornberg A 1982. Supplement to DNA replication, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Kotani H, Ishizaki Y, Hiraoka N, Obayashi A (1987) Nucleotide sequence and expression of the cloned gene of bacteriophage SP6 RNA polymerase. *Nuc Acids Res* 15:2657-2664
- Kouzarides T, Bankin AT, Satchwell SC, Weston K, Tomlinson P, Barrel BG (1987) Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* 61:125-133
- Kück U (1981) Struktur und Funktion mitochondrialer DNA bei Pilzen. *Bibliotheca Mycologica* 84
- Kunkel TA (1988) Exonucleolytic proofreading. *Cell* 53:837-840
- Kuzmin EV, Levchenko IV, Zaitseva GN (1988) S2 plasmid from cms-S-maize mitochondria potentially encodes a specific RNA polymerase. *Nuc Acids Res* 16:4177
- Kuzmin EV, Levchenko JV (1987) S1 plasmid from cms-S-maize mitochondria encodes a viral type DNA-polymerase. *Nuc Acids Res* 15:6758
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic structure from nucleotide sequence data: application to histocompatibility antigens. *J Mol Biol* 157:105-132
- Lambowitz AM, Akins RA, Kelley RL, Pande S, Nargang FE (1986) Mitochondrial plasmids of Neurospora and other filamentous fungi. In: Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. Basic Life Sciences, Vol.40. Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz AM, Gunsalus JC, Hollaender A, eds. Plenum Press, New York London. 83-92

- Lang BF (1984) The mitochondrial genome of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe: highly homologous introns are inserted at the same position of the otherwise less conserved *cox1* genes in Schizosaccharomyces pombe and Aspergillus nidulans. EMBO J 3:2129-2136
- Leavitt MC, Ito J (1987) Nucleotide sequence of bacillusphage Nf terminal protein gene. Nuc Acids Res 13:5251-5259
- Lechner RL, Kelly TJ (1977) The structure of replicating Adenovirus 2 DNA molecules. Cell 12:1007-1020
- Levings III CS, Sederoff RR (1983) Nucleotide sequence of the S2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. Proc Natl Acad Sci USA 80:4055-4059
- Levings III CS, Sederoff RR, Hu WWL, Timothy DH (1983) Relationships among plasmid-like DNAs of the maize mitochondria. In: Structure and function of plant genomes. Life Sciences, Vol. 63. Clferri O, Dure III L, eds. Plenum Press, New York London. 363-372
- Lilley DMJ (1988) DNA opens up - supercoiling and heavy breathing. TIG 4:111-114
- Maizels N, Weiner A (1988) RNA editing: In search of a template (1988) Nature 334: 469-470
- Mandler J (1988) HYSTRUC: hydropathy and secondary structure prediction. CABIOS 4:309
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Manson JC, Liddell AD, Leaver CJ, Murray K (1986) A protein specific to mitochondria from S-type male-sterile cytoplasm of maize is encoded by an episomal DNA. EMBO J 5:2775-2780
- Marechal L, Runeberg-Roos P, Grienemberger JM, Colin J, Weil J-H, Lejeune B, Quetier F, Lonsdale DM (1987) Homology in the region containing a tRNA^{Trp} gene and a (complete or partial) tRNA^{Pro} gene in wheat mitochondrial and chloroplast genome. Curr Genet 12:91-98
- Marechal-Drouard L, Weil J-H, Guillemaut P (1988) Import of several tRNAs from the cytoplasm into the mitochondria in bean Phaseolus vulgaris. Nuc Acids Res 16:4777-4789
- Masters BS, Stohl LL, Clayton DA (1987) Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophage T3 and T7. Cell 51:89-99
- Maxam AM, Gilbert W (1980) Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. Meth Enzymol 65:499-560
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J Mol Biol 110:119-146
- McGraw NJ, Bailey JN, Cleaves GR, Dembinski DR, Gocke CR, Joliffe LK, MacWright RS, McAllister WT (1985) Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase. Nuc Acids Res 13:6753-6766

- Meinhardt F, Esser K (1987) The plasmids of the morels: characterization and prerequisites for vector development. *Appl Microbiol Biotechnol* 27:276-282
- Meinhardt F, Kempken F, Esser K (1986) Proteins are attached to the ends of a linear plasmid in the filamentous fungus Ascobolus immersus. *Curr Genet* 11: 243-246
- Michel F, Dujon B (1983) Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *EMBO J* 2:33-38
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 47-55.
- Moffatt BA, Dunn JJ, Studier FW (1984) Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol* 173:265-269
- Mohan M, Meyer RJ, Anderson JB, Horgen PA (1984) Plasmid-like DNAs in the commercially important mushroom genus Agaricus. *Curr Genet* 8:615-619
- Moore GP (1983) Slipped-mispairing and the evolution of introns. *TIBS* 8:411-414
- Morris CE, McGraw NJ, Joho K, Brown JE, Klement JF, Ling ML, McAllister WT (1987) Mechanisms of promotor recognition by the bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases. in: RNA polymerase and regulation of transcription. Rezinoff WS, Burgess RR, Dahlberg JE, Gross CA, Record MT, Wickens MP, eds. Elsevier Science Publishers, New York. 47-58
- Nargang FE, Bell JB, Stohl LL, Lambowitz AM (1984) The DNA sequence and genetic organisation of a Neurospora mitochondrial plasmid suggest a relationship to introns and mobile elements. *Cell* 38:441-453
- Natvig DC, May G, Taylor JW (1984) Distribution and evolutionary significance of mitochondrial plasmids in Neurospora spec. *J Bacteriol* 159:288-293
- Nelson MA, Macino G (1985) Gene organization and expression in Neurospora crassa mitochondria. In: Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol.II Biogenesis. Quagliariello E, Slater EC, Palmieri F, Saccone C, Kroon AM, eds. Elsevier, Amsterdam New York Oxford. 293-304
- Nelson MA, Macino G (1987) Structure and expression of the overlapping ND4L and ND5 genes of Neurospora crassa mitochondria. *Mol Gen Genet* 206:307-317
- Netzker R, Köchel HG, Basak N, Küntzel H (1982) Nucleotide sequence of Aspergillus nidulans mt genes coding for ATPase subunit 6, cytochrom oxidase subunit 3, seven unidentified proteins, four tRNAs and lrRNA. *Nuc Acids Res* 10:4783-4794
- Newton KJ (1988) Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variations. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 39:503-532
- Niwa O, Sakaguchi K, Gunge N (1981) Curing of the killer deoxyriboNuc acid plasmids of Kluyveromyces lactis. *J Bacteriol* 148:988-990
- Normand P, Simonet P, Giasson L, Ravel-Chapius P, Fortin JA, Lalonde M (1987) Presence of a linear plasmid-like molecule in the fungal pathogen Ceratocystis fimbriata Ell.& Halst.. *Curr Genet* 11:335-338
- Norrandner J, Kempe T, Messing J (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodesoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26:101-106

- Oeser B (1988) S2 plasmid from Zea mays probably encodes a specific RNA polymerase: an alternative alignment. *Nuc Acids Res* 16: 8729
- Ollis DL, Kline C, Steitz TA (1985) Domain of Escherichia coli DNA polymerase I showing sequence homology to T7 DNA polymerase. *Nature* 313:818-819
- Osiewacz HD (1984) Mitochondriale Mosaikgene: Strukturaufklärung eines mobilen Introns aus dem Ascomyceten Podospora anserina. *Bibliotheca Mycologica* 94:
- Osinga KA, Haan Mde, Christian T, Tabak HF (1982) A nonanucleotide sequence involved in promotion of ribosomal RNA synthesis and RNA priming of DNA replication in yeast mitochondria. *Nuc Acids Res* 10:7993-8006
- Pace NR, Olsen GJ, Woese CR (1986) Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45:325-326
- Paillard M, Sederoff RR, Levings III CS (1985) Nucleotide sequence of the S1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *EMBO J* 4:1125-1128
- Pizzagalli A, Valsasnini P, Plevani P, Lucchini G (1988) DNA polymerase I gene of Saccharomyces cerevisiae: Nucleotide sequence, mapping of a temperature-sensitive mutation and protein homology with other DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3772-3776
- Pring DR, Lonsdale DM (1985) Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA. *Int Rev Cytol* 97:1-46
- Pruijn GJM, van Driel W, van der Vliet PC (1986) Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication. *Nature* 322:656-659
- Queen C, Korn LJ (1984) A comprehensive sequence analysis program for the IBM personal computer. *Nuc Acids Res* 12:581-599
- Quinn JP, McGeoch DJ (1985) DNA sequence of the region in the genome of herpes simplex virus type 1 containing the genes for DNA polymerase and the major DNA binding protein. *Nuc Acids Res* 13:8143-8163
- Rawlins DR, Rosenfeld PJ, Wides RJ, Challberg MD, Kelly TJ (1984) Structure and function of the adenovirus origin of replication. *Cell* 37:309-319
- Reha-Krantz LJ (1988) Amino acid changes coded by bacteriophage T4 DNA polymerase mutator mutants: relating structure to function. *J Mol Biol* 202:711-724
- Romanos MA, Boyd A (1988) A transcriptionell barrier to expression of cloned toxin genes of the linear plasmid K1 of Kluyveromyces lactis: evidence that native K1 has novel promoters. *Nuc Acids Res* 16:7333-7350
- Salas M (1988) Initiation of DNA replication by primer proteins: bacteriophage Phi29 and its relatives. *Curr Top Microbiol Immun* 136:72-88
- Samac DA, Leong SA (1988) Two linear plasmids in mitochondria of Fusarium solani f.sp. cucurbitae. *Plasmid* 19:57-67
- Savilahti H, Bamford DH (1987) The complete nucleotide sequence of the left very early region of Escherichia coli bacteriophage PRD1 coding for the terminal protein and the DNA polymerase. *Gene* 57:121-130

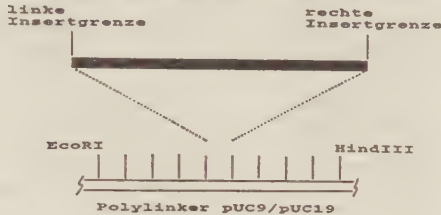
- Schardl CL, Lonsdale DM, Pring DR, Rose KR (1984) Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. *Nature* 310:292-296
- Schardl CL, Pring DR, Lonsdale DM (1985) Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S-type male-sterile maize. *Cell* 43:361-368
- Schinkel AH, Groot Koerkamp HJA, Horst GTJ van der, Touev EPW, Osinga KA, Bleik AM van der, Veeneman GM, Boom JH van, Tabak HF (1986) Characterisation of the promoter of the large ribosomal RNA gene in yeast mitochondria and separation of mitochondrial RNA polymerase into two different functional components. *EMBO J* 5:1041-1047
- Schinkel AH, GrootKoerkamp HJA, Tabak HF (1988) Mitochondrial RNA polymerase of Saccharomyces cerevisiae: composition and mechanism of promotor recognition. *EMBO J* 7:3255-3262
- Schulz M, Freisen-Ralsen U, Jessberger R, Doerfler W (1987) Transcriptional activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA. *J Virol* 61:344-353
- Sharp PA (1985) On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42:397-400
- Shinagawa M, Iida Y, Matsuda A, Tsukiyama T, Sato G (1987) Phylogenic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. *Gene* 55:85-93
- Smart JE, Stillman BW (1982) Adenovirus terminal protein precursor. *J Biol Chem* 257:13499-13506
- Sor F, Fukuhara H (1985) Structure of a linear plasmid of the yeast Kluyveromyces lactis: compact organization of the killer genome. *Curr Genet* 9:147-155
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Spicer EK, Rush J, Fung C, Reha-Krantz LJ, Karam JD, Konigsberg WH (1988) Primary structure of T4 DNA polymerase. Evolutionary relatedness to eucaryotic and other procaryotic DNA polymerases. *J Biol Chem* 263:7478-7486
- Stam JC, Kwakman J, Meijer M, Stuitje AR (1986) Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of Kluyveromyces lactis: Evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nuc Acids Res* 14:6871-6884
- Stark MJR, Boyd A (1986) The killer toxin of Kluyveromyces lactis: characterisation of the toxin subunits and identification of the genes which encodes them. *EMBO J* 5:1995-2002
- Stark MJR, Mileham AJ, Romanos MA, Boyd A (1984) Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast Kluyveromyces lactis. *Nuc Acids Res* 12:6011-6030
- Stohl LL, Collins RA, Cole MD, Lambowitz AM (1982) Characterisation of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild type Neurospora intermedia strain. *Nuc Acids Res* 10:1439-1458

- Suyama J (1986) Two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis analysis of Tetrahymena mitochondrial tRNA. *Curr Genet* 10:411-420
- Sweetser D, Nonet M, Young RA (1987) Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1192-1196
- Tamanoi F (1986) On the mechanism of adenovirus DNA replication. In: Adenovirus DNA. Doerfler W, ed. Martinus Nijhoff, Boston. 97-128
- Ticho BS, Getz GS (1988) The characterization of yeast mitochondrial RNA polymerase. A monomer of 150,000 daltons with a transcription factor of 70,000 daltons. *J Biol Chem* 263:10096-10103
- Tinoco I, Boere PN, Dengler B, Levin MD (1973) Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature New Biol* 246:40-41
- Tokunaga M, Wada N, Hishinuma F (1987) Expression and identification of immunity determinants on linear DNA killer plasmid pGK11 and pGK12 in Kluyveromyces lactis. *Nuc Acids Res* 15:1031-1046
- Tommasino M, Ricci S, Galeotti CL (1988) Genome organization of the killer plasmid pGK12 from Kluyveromyces lactis. *Nuc Acids Res* 16:5863-5878
- Traynor PL, Levings III CS (1986) Transcription of the S-2 maize mitochondrial plasmid. *Plant Mol Biol* 7:255-263
- Tsurumi T, Maeno K, Nishiyama Y (1987) A single-base change within the DNA polymerase locus of herpes simplex virus type 2 can confer resistance to aphidicolin. *J Virol* 61:388-394
- Tudzynski P (1982) DNA-plasmids in eukaryotes with emphasis on mitochondria. *Progress Bot* 44:297-307
- Tudzynski P, Düvell A (1985) Molecular aspects of mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids in Claviceps purpurea. In: Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol.II Biogenesis. Quagliariello E, Slater EC, Palmieri F, Saccone C, Kroon AM, eds. Elsevier, Amsterdam New York Oxford. 249-256
- Tudzynski P, Esser K (1986) Extrachromosomal genetics of Claviceps purpurea. II.Plasmids in various wild strains and integrated plasmid sequences in mitochondrial genomic DNA. *Curr Genet* 10:463-467
- Tudzynski P, Düvell A, Esser K (1983) Extrachromosomal genetics of Claviceps purpurea. I. Mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids. *Curr Genet* 7: 145-150
- Tudzynski P, Rogmann P, Neuhaus H (1986) Extrachromosomal inheritance: mitochondrial genetics. *Progress Bot* 48: 249-259
- Tudzynski P, Düvell A, Oeser B (1986) Linear plasmids in the phytopathogenic fungus Claviceps purpurea. In: Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. Basic Life Sciences, Vol.40. Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz AM, Gunsalus JC, Hollaender A, eds. Plenum Press, New York, London. 93-103
- Turpen T, Garger SJ, Marks MD, Grill LK (1987) Molecular cloning and physical characterization of a Brassica linear mitochondrial plasmid. *Mol Gen Genet* 209:227-233
- Umesono K, Ozaki H (1987) Chloroplast gene organization in plants. *TIG* 3:281-287

- Vartapetyan AB (1987) Proteins covalently bound to genomes of DNA- and RNA-containing viruses. *Molekulyarnaya Biologiya* 21:724-728
- Viera J, Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268
- Wallace DC (1982) Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev* 46:208-240
- Waring RB, Brown TA, Ray JA, Scazzocchio C, Davies RW (1984) Three variants of the same general class in the mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit 1 in Aspergillus nidulans. *EMBO J* 3:2121-2128
- Watson DW, Hopkins NH, Roberts JW, Argetsinger Steitz J, Weiner AM (1987) Molecular biology of the gene, Benjamin/Cummings, Menlo Park Reading Don Mills Wokingham Amsterdam Sydney Singapore Tokyo Madrid Bogota Santiago San Juan.
- Wesolowski M, Algeri A, Goffrini P, Fukuhara H (1982) Killer DNA plasmids of the yeast Kluyveromyces lactis. I. Mutations affecting the killer phenotype. *Curr Genet* 5:191-197
- Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz A, Gunsalus FC, Hollaender A (1986). Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. *Basic Life Sciences*, Vol.40, Plenum Press, New York London.
- Wong SW, Wahl AF, Yuan P-M, Arai N, Pearson BE, Arai K, Korn D, Hunkapiller MW, Wang TB-F (1988) Human DNA polymerase α gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J* 7:37-47
- Wong TW, Clayton DA (1986) DNA primase of human mitochondria is associated with structural RNA that is essential for enzymatic activity. *Cell* 45:817-825
- Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, Woese CB (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4443-4447
- Yoshikawa H, Garvey KJ, Ito J (1985) Nucleotide sequence analysis of DNA replication origins of the small Bacillus bacteriophages: evolutionary relationships. *Gene* 37:125-130
- Yoshikawa H, Ito J (1982) Nucleotide sequence of the major early region of bacteriophage Phi29. *Gene* 17:323-335
- Zabala G, O'Brien-Vedder C, Walbot V (1987) S2 episome of maize mitochondria encodes an 130-kilodalton protein found in male sterile and fertile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7861-7865
- Zabala G, Walbot V (1988) An S1 episomal gene of maize mitochondria is expressed in male sterile and fertile plants of the S-type cytoplasm. *Mol Gen Genet* 211:386-392
- Zmudzka BZ, SenGupta D, Matsukaya A, Cobiauchi F, Kumar P, Wilson SH (1986) Structure of rat DNA polymerase β revealed by partial amino acid sequencing and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5106-5110

Anhang A: Hybridplasmide, die im Rahmen der Arbeit konstruiert wurden

Es werden die Art der Klonierung, der Name der entstandenen Hybridplasmide und die Grenzen des jeweiligen Insertes (pClK1 s.Abb3 und hmw mtDNA von W3 s.Abb.16) angegeben. Die Orientierung des Insertes ist in Bezug auf den Vektor die folgende:



pClK1 (Stamm K)

- Deletionsklonierung (nach Henikoff 1984) des Hybridplasmides pPKH1 (Düvell 1988) mit PstI/BamHI in den E. coli-Stamm JM83

Name	Insert
pPKH1Δ 1920	3842 - 4831
pPKH1Δ 1830	3842 - 4923
pPKH1Δ 1360	3842 - 5397
pPKH1Δ 880	3842 - 5864
pPKH1Δ 728	3842 - 6024

- Deletionsklonierung (nach Henikoff 1984) des Hybridplasmides pPKH1 (Düvell 1988) mit PstI/BamHI in den E. coli-Stamm DH5α

Name	Insert
pPKH1Δ 2420	3842 - 4332
pPKH1Δ 1110	3842 - 5643
pPKH1Δ 620	3842 - 6134
pPKH1Δ 240	3842 - 6508

- Umklonierung des EcoRI/1-Fragmentes von pClK1 aus dem Hybridplasmid pPKE1/1 (Düvell 1988) in den Vektor pUC19/EcoRI (Empfänger-Stamm JM83)

Name	Insert
pPKE1/2	544 - 5114

- Deletionsklonierung (nach Henikoff 1984) des Hybridplasmides pPKE1/2 mit PstI/BamHI in den E. coli-Stamm JM83

Name	Insert
pPKE1/2 Δ 4290	544 - 825
pPKE1/2 Δ 4120	544 - 991
pPKE1/2 Δ 3720	544 - 1390
pPKE1/2 Δ 3250	544 - 1862
pPKE1/2 Δ 3140	544 - 1978
pPKE1/2 Δ 2860	544 - 2251
pPKE1/2 Δ 2680	544 - 2436
pPKE1/2 Δ 2470	544 - 2645
pPKE1/2 Δ 1970	544 - 3146
pPKE1/2 Δ 1570	544 - 3544
pPKE1/2 Δ 680	544 - 4430
pPKE1/2 Δ 410	544 - 4708

- Umlonierung des EcoRI/3-Fragmentes von pClKlaus dem Hybridplasmid pPKH1 (Düvell 1988) in den Vektor pUC19/EcoRI (Empfänger-Stamm JM83)

Name	Insert
pPKE3/2	5114 - 5700

- Subklonierung des EcoRI/1-Fragmentes von pClK1 aus dem Hybridplasmid pPKE1/2 mit ClaI in den Vektor pUC19/HindII (Empfänger-Stamm JM83)

Name	Insert
pPKCE3	3987 - 5114

- Shotgun-Klonierung von pClK1 mit XbaI in den Vektor pUC19/XbaI (Empfänger-Stamm DH5α)

Name	Insert
pPKX2	4879 - 2646
pPKX4	5502 - 48787

- Shotgun-Klonierung von pClK1 mit HindII in den Vektor pUC19/HindII (Empfänger-Stamm DH5α)

Name	Insert
pPKHi3	1 - 591

- Shotgun-Klonierung von pClK1 mit TaqI in den Vektor pUC19/AccI (Empfänger-Stamm DH5a)

Name	Insert
pPKT1+5	1222 - 2758*/4678 - 5186
pPKT3	18 - 576
pPKT4	3563 - 3035
pPKT6	6735 - 6237
pPKT7	3564 - 3986
pPKT8+18	4677 - 4269/4268 - 4245
pPKT9+1	2758 - 1222/886 - 1221
pPKT14+9	886 - 1221/6081 - 6190
pPKT16+1	6191 - 6236/1222 -2758
* Orientierung blieb unbestimmt.	

- Subklonierung des PstI+HindII/2-Fragmentes des pPKT14+9-Insertes in den Vektor pUC19/PstI+HindII (Empfänger-Stamm DH5a)
(Anmerkung: Die ursprünglich im Grundvektor des Hybridplasmides pPKT14+9 gelegene HindII-Schnittstelle wurde bei der Konstruktion des Hybridplasmides zerstört.)

Name	Insert
pPKHiT13	1094 - 886

- Deletionsklonierung (nach Henikoff 1984) des Hybridplasmides pPKT16+1 mit SacI/BamHI in den E. coli-Stamm DH5a

Name	Insert
pPKT16+1 Δ 160	1336 - 2758
pPKT16+1 Δ 250	1428 - 2758
pPKT16+1 Δ 600	1779 - 2758
pPKT16+1 Δ 620	1800 - 2758
pPKT16+1 Δ 880	2060 - 2758
pPKT16+1 Δ 1160	2340 - 2758

- Deletionsklonierung (nach Henikoff 1984) des Hybridplasmides pPKT9+1 mit SacI/BamHI in den E. coli-Stamm DH5a

Name	Insert
pPKT9+1 Δ 490	2602 - 1222

hmw mtDNA (Stamm W3)

- Subklonierung des EcoRI+Sali/3-Fragmentes der hmw mtDNA (W3) aus dem Hybridplasmid **pWE2/1** in den Vektor pUC9/EcoRI+Sali (Empfänger-Stamm JM83): Hybridplasmid **pWES3**
- Shotgun-Klonierung des **pWES3**-Insertes mit **HaeIII** in den Vektor pUC9/SmaI (Empfänger-Stamm JM83)

Name	Insert
pW _a 1	1829 - 287
pW _a 2	286 - 1

- Klonierung des Sau3A/1-Fragmentes des **pWES3**-Insertes in den Vektor pUC19/BamHI (Empfänger-Stamm DH5a): pW_a3
- Deletionsklonierung (nach Henikoff 1984) des Hybridplasmides pW_a1 mit PstI/BamHI in den E. coli-Stamm DH5a

Name	Insert
pW _a 1Δ 160	1829 - 444
pW _a 1Δ 300	1829 - 585
pW _a 1Δ 570	1829 - 860
pW _a 1Δ 1340	1829 - 1627

- Shotgun-Klonierung des pW_a1-Insertes mit **HinfI** in den Vektor pUC19/SmaI (Empfänger-Stamm DH5a)

Name	Insert
pW _a 1-Hf1	744 - 1400

- Shotgun-Klonierung des pW_a1-Insertes mit **AluI** in den Vektor pUC19/HindII (Empfänger-Stamm DH5a)

Name	Insert
pW _a 1-A1	750 - 430
pW _a 1-A4	1091 - 1301
pW _a 1-A6	896 - 1090
pW _a 1-A3	1302 - 1543
pW _a 1-A8	1544 - 1633

- Klonierung: pWd1 mit EcoRI/AluI/SalI geschnitten und wieder ligiert (Empfänger-Stamm DH5a)

Name	Insert
pWd4	1829 - 1634/431 - 287

Anhang B: Vergleich der verschiedenen DNA-Polymerasen, die Homologie zum
URF1-Produkt des Plasmides pClK1 besitzen

Die Herkunft der DNA-Polymerasen ist mit denselben Abkürzungen gekennzeichnet wie in Abb.9. Es ist jeweils die Länge einer Homologie (y) und die Anzahl der gleichen Aminosäuren (x) angegeben: x/y. I, II, III deuten die Lage der Homologie in Bezug auf die drei konservierten Domänen an. Jeder Vergleich ist nur einmal aufgeführt. Es gibt Fälle, in denen das Computerprogramm unter den verwendeten Bedingungen keine Homologie finden konnte, da sich die Homologie auf die in Abb.9 gezeigten Domänen beschränkte. Solche Fälle werden hier nicht aufgeführt.

pClK1 - S1: 95/256 (I,II) 34/69 (III)
" - pGK11: 13/30 (III)
" - PHI29: 29/85 (II)
" - PRD1: 11/18 (I) 20/47 (II)
" - Ad2: 9/16

S1 - pGK11: 44/138 (I) 19/54 (II)
" - pGK12: 31/83 (I)
" - PHI29: 26/72 (II)
" - PRD1: 14/34 (I) 29/68 (II)
" - T4: 8/12 (II)
" - Ad2: 8/10
" - Vaccinia: 16/36 (II)
" - Pola: 24/63 (I)

pGK11 - pGK12: 125/393 (I,II) 56/176 (III) 39/123
" - PHI29: 11/18 (I) 20/57 (II) 17/34 (III)
" - PRD1: 15/32 (I) 36/96
" - HSV: 31/75 (III)
" - Pola: 27/67 (III)

pGK12 - PHI29: 18/44 (III)
" - HSV: 10/11 (III)
" - Pola: 18/45 (III)

PHI29 - PRD1: 28/56 (I) 26/66 (II) 16/29 (III)
" - Ad2: 10/17 (II)
" - HSV: 11/17 (III)
" - Vaccinia: 13/30 (III)

PRD1 - Ad2: 13/33 (I)

T4 - HSV: 10/15 (I)
" - Vaccinia: 26/63 (I)
" - Pola: 17/43 (I) 12/27

Ad2 - HSV: 10/13 (III) 11/24
" - Vaccinia: 11/13 (III)
" - Pola: 13/20

HSV - Vaccinia: 16/41 (I) 25/82 (III)
" - Pola: 59/156 (I,II) 21/59 (III)

Vaccinia - Pola: 33/84 (II) 28/90 (III)

Vorveröffentlichungenn

- 1) Tudzynski P, Düvell A, Oeser B
(1986)
Linear plasmids in the phytopathogenic fungus Claviceps purpurea.
In: Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. Basic Life Sciences,
Vol.40. Wickner RB, Hinnebusch A, Lambowitz AM, Gunsalus
JC, Hollaender A, eds. Plenum Press, New York, London. 93-103
- 2) Düvell A, Hessberg-Stutzke H, Oeser B, Rogmann-Backwinkel P, Tudzynski P
(1988)
Structural and functional analysis of mitochondrial plasmids in Claviceps
purpurea.
Mol Gen Genet (Im Druck)

Lebenslauf

Birgitt M. Oeser

geboren am 13. August 1959 in Dülmen

Eltern: Annchen Oeser, geb. Kirschner, Hausfrau
Dr. phil. Wolfgang Oeser, Studiendirektor

1966 - 1966	kath. Volksschule Lenneplatz, Bochum-Grumme
1966 - 1969	Grundschule Kassenbergerstraße, Bochum-Oberdahlhausen
1969 - 1978	Theodor-Körner-Schule, Bochum-Dahlhausen
1978	Abitur
1978 - 1984	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit Abschluß Diplom
1985 - 1988	Promotion bei Prof. Dr. P. Tudzynski mit dem Thema "Untersu- suchungen zur Molekularbiologie linearer Plasmide bei <i>Claviceps</i> <i>purpurea</i> " (1985 - 1986 Lehrstuhl für Allg. Botanik der Ruhr- Universität Bochum, 1986 - 1988 Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf, 1988 Lehrstuhl für Allg. Botanik/Mikro- biologie der Westf. Wilhelms-Universität Münster)

